

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



TESIS DOCTORAL

**Validación de la enzima ICMT como una nueva diana
terapéutica para el tratamiento del cáncer y la progeria**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Jesús Ortega Nogales

Directores

María Luz López Rodríguez
Silvia Ortega Gutiérrez
M^a del Mar Martín-Fontecha Corrales

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica I



**VALIDACIÓN DE LA ENZIMA ICMT COMO UNA NUEVA DIANA
TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER Y LA
PROGERIA**

**Memoria que para optar al
TÍTULO DE DOCTOR
presenta**

Francisco Jesús Ortega Nogales

Directoras:

Dra. María Luz López Rodríguez

Dra. Silvia Ortega Gutiérrez

Dra. M^a del Mar Martín-Fontecha Corrales

MADRID, 2016

*“He who says he can and he who says he can’t,
are both usually right.”*

Confucius

A mi familia.

*El presente trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Química Médica en el Departamento de Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la supervisión de la **Catedrática Dra. María Luz López Rodríguez** y de las **Dras. Silvia Ortega Gutiérrez** y **María del Mar Martín-Fontecha Corrales** a quienes deseo expresar mi más sincero agradecimiento por su acogida en este grupo de investigación y por la confianza incondicional depositada en mí desde el primer momento. Además de buena parte de mis conocimientos científicos, a ellas les debo mi perseverancia en la persecución de los objetivos, sean cuales fueren las dificultades del camino.*

Asimismo, quiero expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Antonio Romero, que dirige el grupo de Biología Estructural de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB - CSIC), por su acogida en este grupo de investigación durante mi estancia allí y por toda la ayuda que me ha prestado. Gracias a Andrea, Elena, Fabiola, Fede, Irene, Mer y especialmente al Dr. Javier Medrano por su paciencia y dedicación en la enseñanza a un químico que se adentra en el mundo de la biología molecular. Me han hecho sentir como en casa.

A los Profesores Dr. Leonardo Pardo y Dra. Mercedes Campillo, y a Iván R. Torrecillas, del Laboratorio de Medicina Computacional de la Universidad Autónoma de Barcelona por llevar a cabo la elaboración del modelo estructural por homología de la enzima Hs-ICMT y el modelo de farmacóforo. A los Profesores José Antonio Ramos y Javier Fernández, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, en cuyo laboratorio he llevado a cabo los ensayos de actividad de la enzima ICMT. Al Profesor Dr. Carlos López Otín, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, por proporcionarnos el modelo celular necesario para llevar a cabo los estudios de progeria. Al Profesor Dr. Roberto Martínez por su admisión en el Departamento de Química Orgánica I de la Universidad Complutense de Madrid.

Asimismo, quiero agradecer al personal de los distintos CAIs de la UCM (especialmente a Ángel, Lola y Elena del CAI de RMN) y Juan José Redondo, secretario del Departamento, su inestimable ayuda a lo largo de estos años.

A mis compañeros Ainoa, Álvaro, Ana, Ana Gil, Ángeles, Bellinda, Carlos, Clara, Dani, Debora, Ernesto, Fernando, Gloria, Henar, Inés, Javi, Jorge, Leticia, Luke, Marta, Moisés, Nagore, Nono, Pablo, Paloma, Sergio y Volker; así como a los demás compañeros del departamento. Gracias a todos ellos por el entusiasmo y compañerismo que han demostrado; de todos he aprendido algo.

Y por último y especialmente, a mi familia y amigos, por compartir conmigo la dureza del camino, por sus palabras y gestos de ánimo en los momentos difíciles. Gracias a mis padres y a mi hermana por aguantar mis manías a tiempo completo. Y gracias a Chusa, Cristian, Delia, Lorena, Santi y a los chicos y chicas de Crisol con los que tantos buenos momentos he compartido.

ÍNDICE

SUMMARY	3
RESUMEN	25
1. INTRODUCCIÓN	49
1.1. Las proteínas CAAX	49
1.2. Procesamiento post-traduccionaL de Ras y prelámina A	50
1.3. Situación actual de las estrategias para la inhibición de la actividad de la proteína Ras	52
1.3.1. Inhibidores de las enzimas FTasa y GGTasa I	54
1.3.2. Inhibidores de la enzima Rce1	56
1.3.3. Inhibidores de la enzima ICMT	56
1.4. Situación actual en el tratamiento de la progeria	59
1.4.1. Tratamientos con células madre	61
1.4.2. Terapias génicas	61
1.4.3. Bloqueo de las modificaciones post-traduccionales de la prelámina A	61
2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	65
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
3.1. Diseño de nuevos inhibidores de la enzima ICMT: elaboración de un modelo de farmacóforo basado en la estructura	69
3.2. Programa de química médica	81
3.3. Evaluación de la capacidad citotóxica de los compuestos con mayor potencia inhibitoria de la actividad ICMT	97
3.4. Perfil farmacocinético <i>in vitro</i> de los compuestos seleccionados UCM1336 y UCM13239	99
3.4. Estudio del compuesto UCM1336 como agente antitumoral	100

3.5. Estudio del compuesto UCM13239 en un modelo celular de progeria	103
4. PARTE EXPERIMENTAL	109
4.1. Modelo computacional de simulación de los complejos inhibidor-enzima <i>Hs-ICMT</i> y generación de un farmacóforo de inhibidores de la enzima	109
4.2. Ensayo de actividad de la enzima ICMT	110
4.2.1. Clonaje y expresión de la enzima ICMT recombinante	110
4.2.2. Ensayo de actividad de la enzima ICMT basado en radiactividad	110
4.3. Síntesis	111
4.3.1. Procedimientos generales	113
4.3.2. Síntesis de los compuestos UCM1333 y UCM13140	114
4.3.3. Síntesis de BFC (7)	118
4.3.4. Síntesis de <i>cysmethynil</i>	121
4.3.5. Síntesis de los compuestos 12 y 13	124
4.3.6. Síntesis de las diamidas 16-23	126
4.3.7. Síntesis de los compuestos 29-35	134
4.3.8. Síntesis de los compuestos 45-56	145
4.3.9. Síntesis de los derivados 70-76	161
4.3.10. Síntesis de los compuestos 79-92	167
4.3.11. Síntesis del compuesto 93	178
4.4. Ensayos de estabilidad	180
4.4.1. Estabilidad en suero	180
4.4.2. Estabilidad en microsomas	181
4.5. Experimentos biológicos	181
4.5.1. Líneas celulares y cultivos	181

4.5.2.	Visualización de Ras	182
4.5.3.	Determinación de los niveles de Ras-GTP	182
4.5.4.	Visualización de progerina	183
4.5.5.	Análisis mediante inmunodetección de los niveles de p-AKT	184
5.	CONCLUSIONES	189
6.	BIBLIOGRAFÍA	193

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Se han utilizado las abreviaturas y acrónimos recomendados por la *American Chemical Society* para el área de Química Orgánica y Química Médica, revisados en las revistas *Journal of Organic Chemistry*ⁱ y *Journal of Medicinal Chemistry*ⁱⁱ en Enero de 2016. Se han empleado adicionalmente los indicados a continuación.

a	Ancho
AdoHcy	S-Adenosil-L-homocisteína
AFC	N-Acetil-S-farnesil-L-cisteína
Ag-ICMT	<i>Anopheles gambiae</i> ICMT
ap	Aparente
ATR	Reflectancia total atenuada
BFC	Biotinil-S-farnesilcisteína
CAI	Centro de Asistencia a la Investigación
CIB	Centro de Investigaciones Biológicas
CCF	Cromatografía en capa fina
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
DE	Desviación estándar
DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo
DM	Dinámica molecular
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FACE-1	<i>Farnesylated-protein converting enzyme 1</i>
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FTasa	Farnesiltransferasa
FTPA	Ácido farnesiltiopropiónico
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPasa
GEF	Factor de intercambio de nucleótidos de guanina

ⁱhttp://pubs.acs.org/paragonplus/submission/joceah/joceah_authguide.pdf

ⁱⁱhttp://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jmcmr/jmcmr_authguide.pdf

GGTasa I	Geranilgeraniltransferasa de tipo I
[³ H]SAM	S-Adenosilmetionina tritiada
HGPS	Síndrome de Hutchinson-Gilford, progeria
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
<i>Hs</i> -ICMT	<i>Homo sapiens</i> ICMT
HYD	Subunidad hidrofóbica
ICMT	Isoprenilcisteína carboximetiltransferasa
<i>Ma</i> -ICMT	<i>Methanosarcina acetivorans</i> ICMT
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MS	Espectrometría de masas
NDS	Suero normal de burro
NGS	Suero normal de cabra
p-AKT	Proteína AKT fosforilada
Pf	Punto de fusión
PKB	Proteína kinasa B
PM	Peso molecular
POPC	1-Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
qt	Quintuplete
RBD	Dominio de unión a Ras
Rce1	<i>Ras converting enzyme 1</i>
RESP	Potencial electrostático restringido
SAM	S-Adenosilmetionina
siARN	ARN interferente
t.a.	Temperatura ambiente
TBTU	O-(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
TMSOTf	Sulfonato de trimetilsililtrifluorometano
t _r	Tiempo de retención
UCM	Universidad Complutense de Madrid
ZMPSTE24	<i>Zinc metalloprotease STE24</i>

SUMMARY

1. INTRODUCTION

The CAAX superfamily of proteins are characterized for the presence of the CAAX tetrapeptide at its carboxyl terminus, in which “C” represents a cysteine, “A” corresponds to an aliphatic aminoacid, and “X” refers to any aminoacid. Several CAAX proteins are implicated in numerous pathologies including cancer¹ and progeria.² In fact, Ras proteins, which are included in the CAAX superfamily of proteins, represent one of the most important superfamily of oncoproteins and they are overexpressed in the 30% of all cancer processes.^{3,4} Regarding to progeria (or Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS), is lamin A, another CAAX protein, the main responsible for the onset of symptoms of the disease.⁵

Due to the presence of the CAAX motif in the carboxyl terminus of their structure, these proteins require a series of post-translational modifications to achieve their biologically active form. Thus, the post-translational processing of Ras involves the attachment of a farnesyl or geranylgeranyl group to the CAAX cysteine by either farnesyltransferase (FTase) or geranylgeranyltransferase type I (GGTase I), respectively. This prenylation step is followed by proteolytic removal of the AAX residues by the endoprotease Ras converting enzyme 1 (Rce1), and final methylation of the newly exposed prenylcysteine by the enzyme isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT).⁶ On the other hand, prelamin A (precursor of lamin A) only can be prenylated by FTase, not by GGTase I, and the proteolytic step can be mediated for both Rce1 and zinc metalloprotease STE24 (ZMPSTE24) enzymes. Then, the carboxyl methylation is catalyzed by the enzyme ICMT and prelamin A requires an additional final step consisting in a second proteolysis regulated by the enzyme ZMPSTE24.⁷

Different strategies have been tried for inhibiting Ras protein, including direct blockade of its activity and regulation of the cellular effectors controlled by Ras. Because none of these strategies have been successful so far, and due to the fact that in absence of any of its post-translational modifications Ras loses its ability to induce tumor transformation,

the enzymes that regulate the post-translational processing of Ras have been proposed as therapeutic targets in drug discovery programs.^{8,9} The initial efforts were focused on the development of FTase inhibitors. Nevertheless, the promising effectivity showed by these compounds in preclinical assays did not correspond to the results obtained in clinical trials, probably due to the alternative prenylation by GGTase I.^{10,11} This fact led to the consideration of the enzyme ICMT as a valuable therapeutic target in the search for anticancer drugs. In the search of ICMT inhibitors, the most potent derivatives characterized so far have been identified by high throughput screening (HTS), which are the indole cysmethynil¹² and a derivative of tetrahydropyrane¹³ (Figure 1). However, cysmethynil has some drawbacks that preclude its development as a drug such as high lipophilicity, poor solubility in water and high affinity for plasma proteins. Meanwhile, and in spite of its good results in biochemical assays against ICMT, the tetrahydropyranyl derivative does not show significant activity in whole cell based assays,¹³ which limits its use as a therapeutic agent.

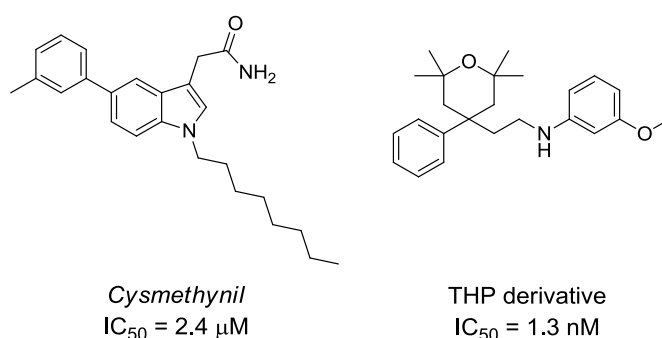


Figure 1. Representative ICMT inhibitors identified by HTS.

With respect to progeria, different strategies have been tried to find a cure for this disease, including stem cell and genetic therapies. However, due to the translational difficulties of these approaches, the inhibition of the post-translational modifications of prelamin A is receiving increased attention as a promising alternative. In this sense, recent studies in a mouse model of progeria have demonstrated that blocking ICMT activity ameliorates this disease.¹⁴

Hence, ICMT inhibition could constitute a promising approach for anticancer drug development, as well as for the treatment of progeria.

2. OBJECTIVES

The main objective of this work is to identify ICMT inhibitors that enable the validation of this enzyme as a therapeutic target for the treatment of diseases such as cancer and progeria. The achievement of this goal involves the following steps:

1. Identification of new hits able to inhibit the ICMT enzyme.
2. Medicinal chemistry program starting from the identified hits.
3. Biological characterization of the selected compounds.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Design of new ICMT inhibitors: elaboration of a structure-based pharmacophore model

Despite the interest generated by the enzyme ICMT in the last years, the development of new inhibitors of this protein has been hampered by the lack of a structural model and its low homology with other known methyltransferases. Although the binding site of the substrate in the *Homo sapiens* ICMT (*Hs*-ICMT) has not been identified yet, there is a prokaryotic ortholog, *Methanosarcina acetivorans* ICMT (*Ma*-ICMT), which presents a 28.4% of sequence similarity, suggesting that both enzymes bind to the cosubstrate S-adenosylmethionine (SAM) in the same manner. Taking into account these considerations, we built a computational model of *Hs*-ICMT based on the crystal structure of *Ma*-ICMT.¹⁵ To do this, we set the inhibitor *N*-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine (AFC) and the cosubstrate SAM as described in the *Ma*-ICMT crystal structure and the stability of the complexes was refined by molecular dynamic (MD) simulations. Figures 2A and 2B show the AFC bound to *Ma*-ICMT and *Hs*-ICMT, respectively. In these models, the carboxyl group from AFC sets an ionic interaction with Arg163 of *Ma*-ICMT (Arg247 of *Hs*-ICMT) and the carbonyl group is engaged through a hydrogen bond to Arg21 in *Ma*-ICMT (Arg174 of *Hs*-ICMT). Moreover, the farnesyl chain of AFC expands along the membrane through the so-called substrate tunnel.

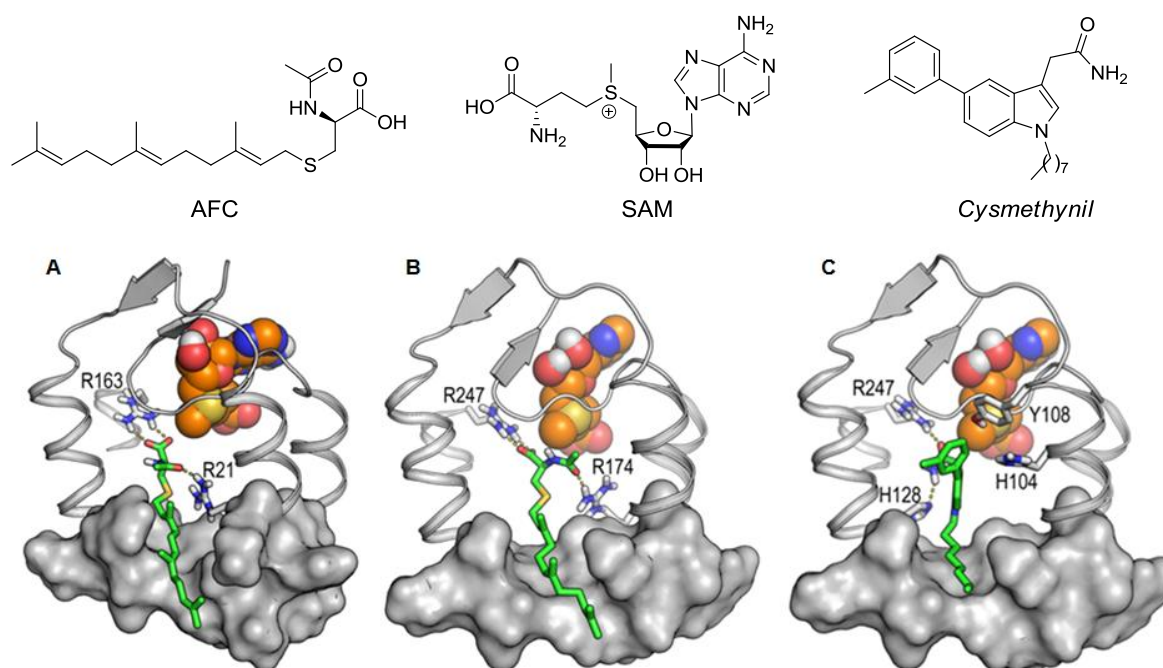


Figure 2. **A.** Representative view of the *Ma*-ICMT structure with the inhibitor AFC (in green) and the cosubstrate SAM (spheres) obtained by MD simulations. **B.** Complex of the homology model of *Hs*-ICMT (obtained from *Ma*-ICMT) with AFC and SAM refined by MD simulations. **C.** Complex of *Hs*-ICMT with cysmethynil and SAM obtained by MD simulations.

The docking of cysmethynil in this model shows the binding of the carbonyl group to Arg247 by a hydrogen bond, while the *m*-tolyl moiety interacts with His104 and Tyr108 (Figure 2C). Moreover, the octyl chain of cysmethynil expands through the membrane in a similar manner than the farnesyl group of AFC. The importance of His104, Tyr 108 and Arg247 to the substrate binding has been confirmed by mutagenesis studies on the eukaryotic ortholog *Anopheles gambiae* ICMT (*Ag*-ICMT).¹⁶

Using these models as a starting point, we built a structure-based pharmacophore model (Figure 3A), consisting in two hydrogen bond acceptor groups (HBA) and a hydrophobic subunit (HYD). This pharmacophore model was used to carry out a screening of a selection of compounds from the Medicinal Chemistry Laboratory of UCM. Initially, this screening process led to compound **UCM1333** (Figure 3B). However, the comparison of the interactions of this derivative with the corresponding to cysmethynil and AFC,

suggested that the incorporation of a hydrophobic chain that expanded through the substrate tunnel would increase the interactions between the enzyme and compound **UCM1333**. Hence, we designed compound **UCM13140** (Figure 4), which incorporates a *n*-octyl chain attached to a nitrogen atom. This derivative was studied by docking in the pharmacophore model (Figure 4), suggesting better interactions than **UCM1333**.

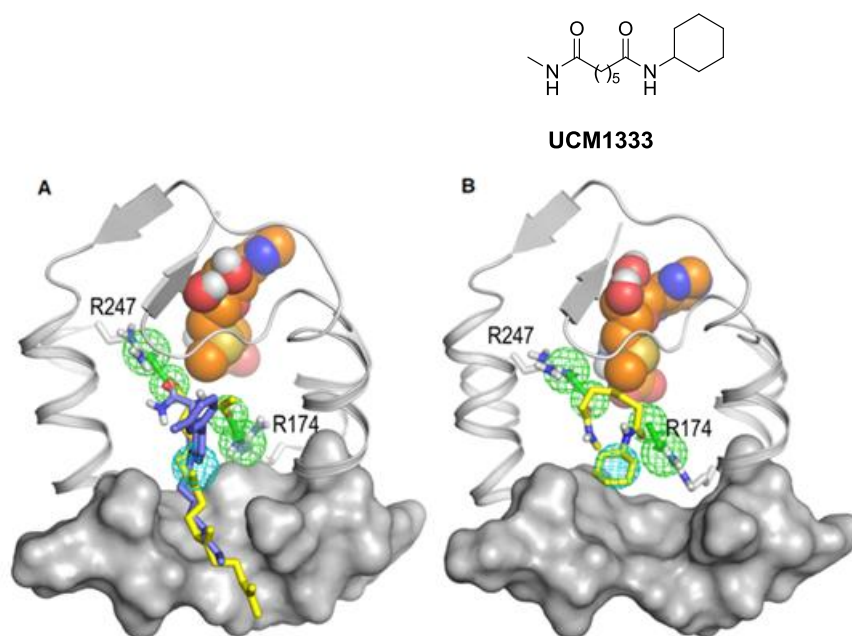


Figure 3. A. Superposition of the complexes formed by *Hs*-ICMT and AFC (in yellow) and cysmethynil (in blue) obtained by MD simulations. These simulations were used to the development of a pharmacophore model constituted by two hydrogen bond acceptor groups (green spheres and arrows) and a hydrophobic subunit (blue sphere). **B.** Compound **UCM1333** (in yellow), from the library of compounds of the Medicinal Chemistry Laboratory of UCM, was identified by adjusting in the pharmacophore model. In both cases, the cosubstrate SAM appears as spheres.

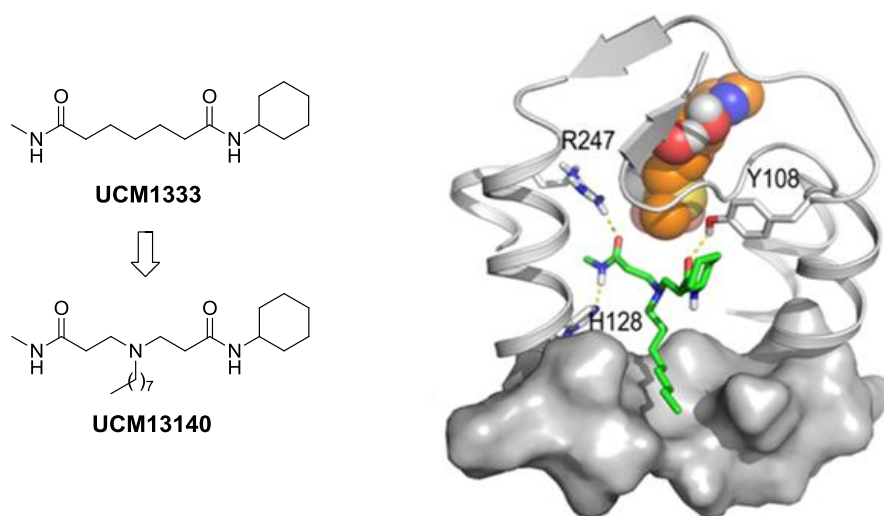


Figure 4. Compound **UCM13140** (in green) has a *n*-octyl chain that can expand through the membrane using the substrate tunnel (plotted as a grey surface), similarly to the hydrophobic chain of cismethynil and AFC. The cosubstrate SAM is shown as spheres.

We synthesized compounds **UCM1333** and **UCM13140**, and we determined their capacity to inhibit the ICMT enzyme, resulting that **UCM1333** is able to block the ICMT activity with a moderate potency (30% of inhibition at 50 μ M), while compound **UCM13140** increases its inhibitory potency to 55% at 50 μ M, so this derivative was considered a hit.

3.2. Medicinal chemistry program

Aimed to identify more potent ICMT inhibitors with good pharmacokinetic properties, we started a medicinal chemistry program from **UCM13140**. Hence, we synthesized compounds **12** and **13** (Figure 5), in which the methyl group was substituted by a hydrophobic (cyclohexyl) or an aromatic (phenyl) moiety. The evaluation of their capacity to inhibit ICMT led us to identify derivative **13** as the most potent one, with an excellent 82% of inhibition at 50 μ M. Further structural exploration involved the synthesis of compounds **16-23** (Figure 5), in which the octyl chain and the phenyl moiety were conserved, and the cyclohexyl ring was replaced by different substituents. The evaluation of their ability to inhibit ICMT indicated that the majority of the changes did not translate into an increase of the inhibitory potency of the compounds, with the only exception of

derivative **21**, which inhibited ICMT with an excellent value of 93% at 50 μM ($\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$) and an acceptable lipophilicity (calculated logarithm of the octanol/water partition coefficient, cLogP , 4.1). We continued the structural exploration of this compound by modifying the lipophilic chain, as well as by introducing substituents on the phenyl ring (Figure 6).

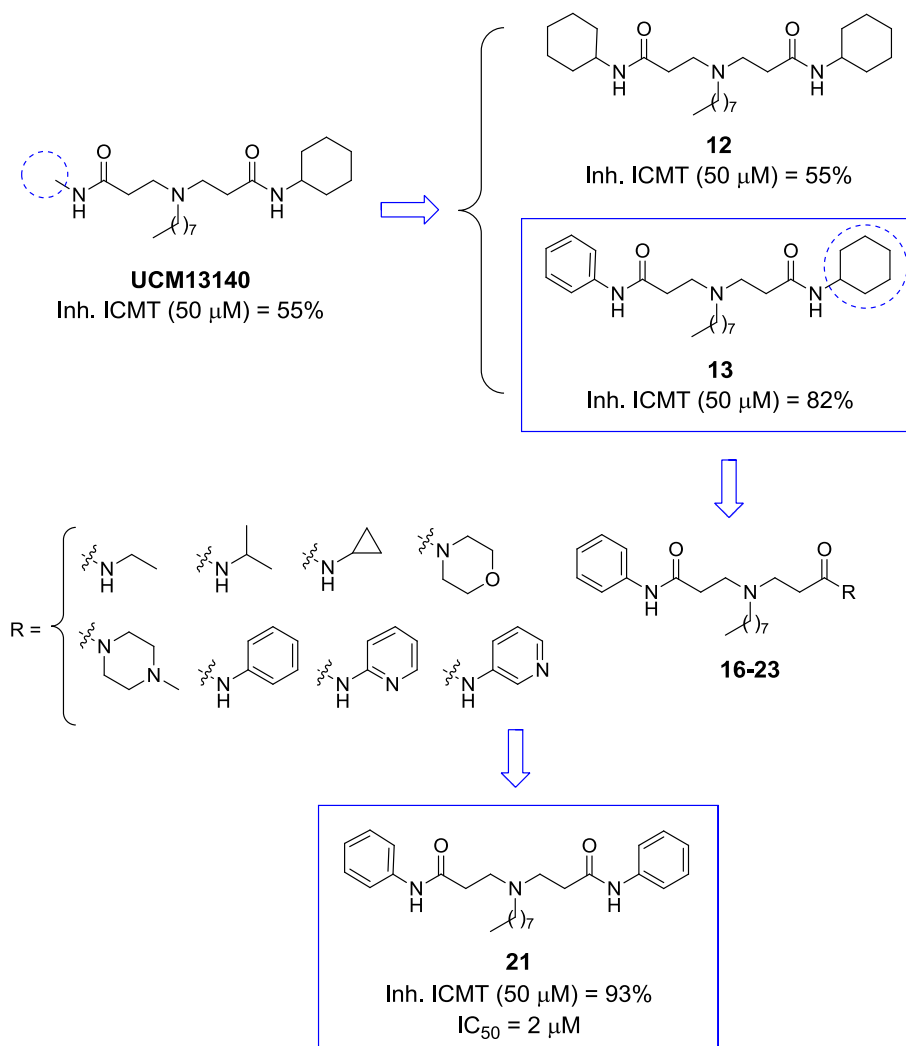


Figure 5. Modifications in the cyclohexyl ring of compound **13**. Identification of derivative **21**.

Summary

In first place we studied the optimal length of the lipophilic chain, as well as the introduction of oxygen atoms. These modifications, aimed at decreasing the lipophilicity of the compounds ($c\text{LogP} = 0.39\text{-}3.05$), led to derivatives **29-35** (Figure 6). The determination of their capacity to inhibit the enzyme ICMT showed that the *n*-octyl chain is an essential requirement for the activity. Then, we synthesized compounds **45-56** (Figure 6), in which we introduced different substituents in one of the phenyl rings. The evaluation of their capacity to block the ICMT activity did not show a clear structure-activity correlation, and none of these compounds was able to improve the inhibitory potency of **21** (93% of inhibition at 50 μM).

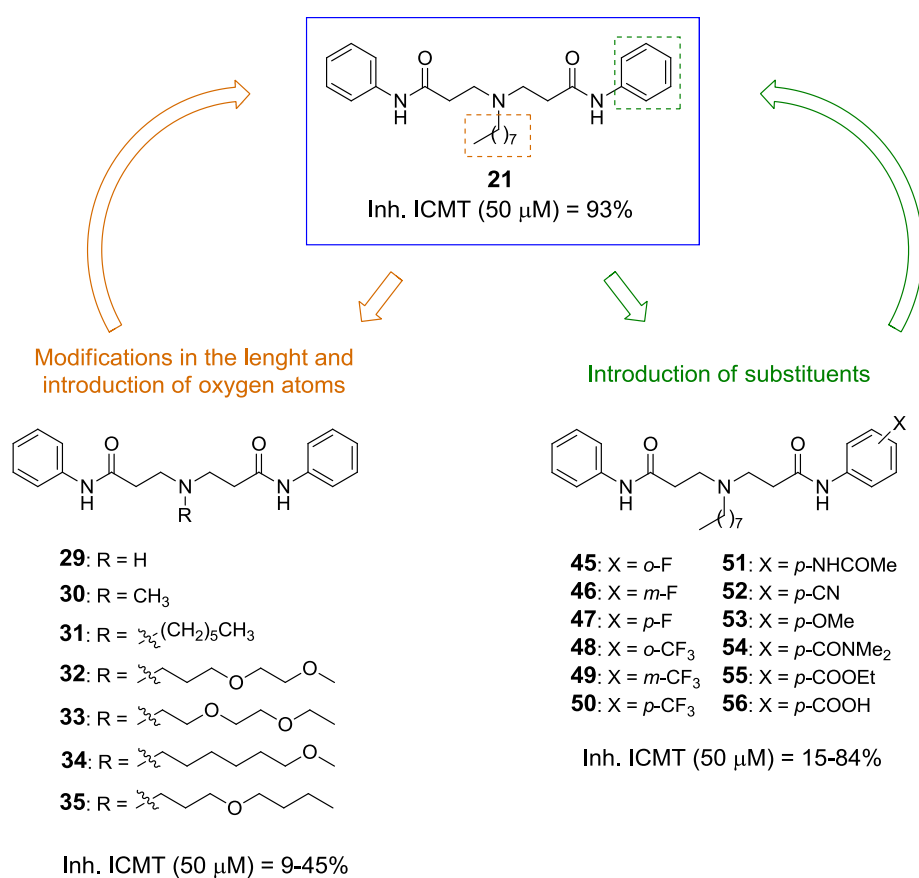


Figure 6. Modifications in the lipophilic chain of **21** (compounds **29-35**) and introduction of substituents in the phenyl ring (compounds **45-56**).

Afterwards we made some modifications in the amide group of compound **21** (Figure 7). On the one hand, we replaced the amide group by a sulfonamide (derivatives **70** and **71**) and the amide group was methylated (compounds **72** and **73**). On the other hand, we studied the influence of shortening the spacer between the tertiary amine and the carbonyl group (compounds **74-76**). The biological evaluation of these compounds pointed out to diamide **76** as the best inhibitor within the series, being able to block the 80% of the ICMT activity at 50 μ M.

Then, to deeply explore the structure-activity relationship on diamide **76**, we synthesized derivatives **79-92** (Figure 7). Compounds **79-85** include different substituents on the phenyl ring, while in derivatives **86-92** the phenyl group was replaced by different heteroaromatic rings. The determination of the inhibitory potency of compounds **79-85** showed that none of the structural modifications improved the inhibition. With respect to the biological evaluation of compounds **86-92**, it showed that the substitution of the phenyl moiety of diamide **76** by a 3-furyl ring (compound **87**, 81% of inhibition at 50 μ M) or a pyrrole group (derivative **89**, 81% of inhibition at 50 μ M) maintained the inhibitory potency. Finally, the reduction of the carbonyl group of compound **87** led to derivative **93** (Figure 7). This modification yielded a good ICMT inhibitor able to block up to the 85% of the enzyme activity at 50 μ M.

Summary

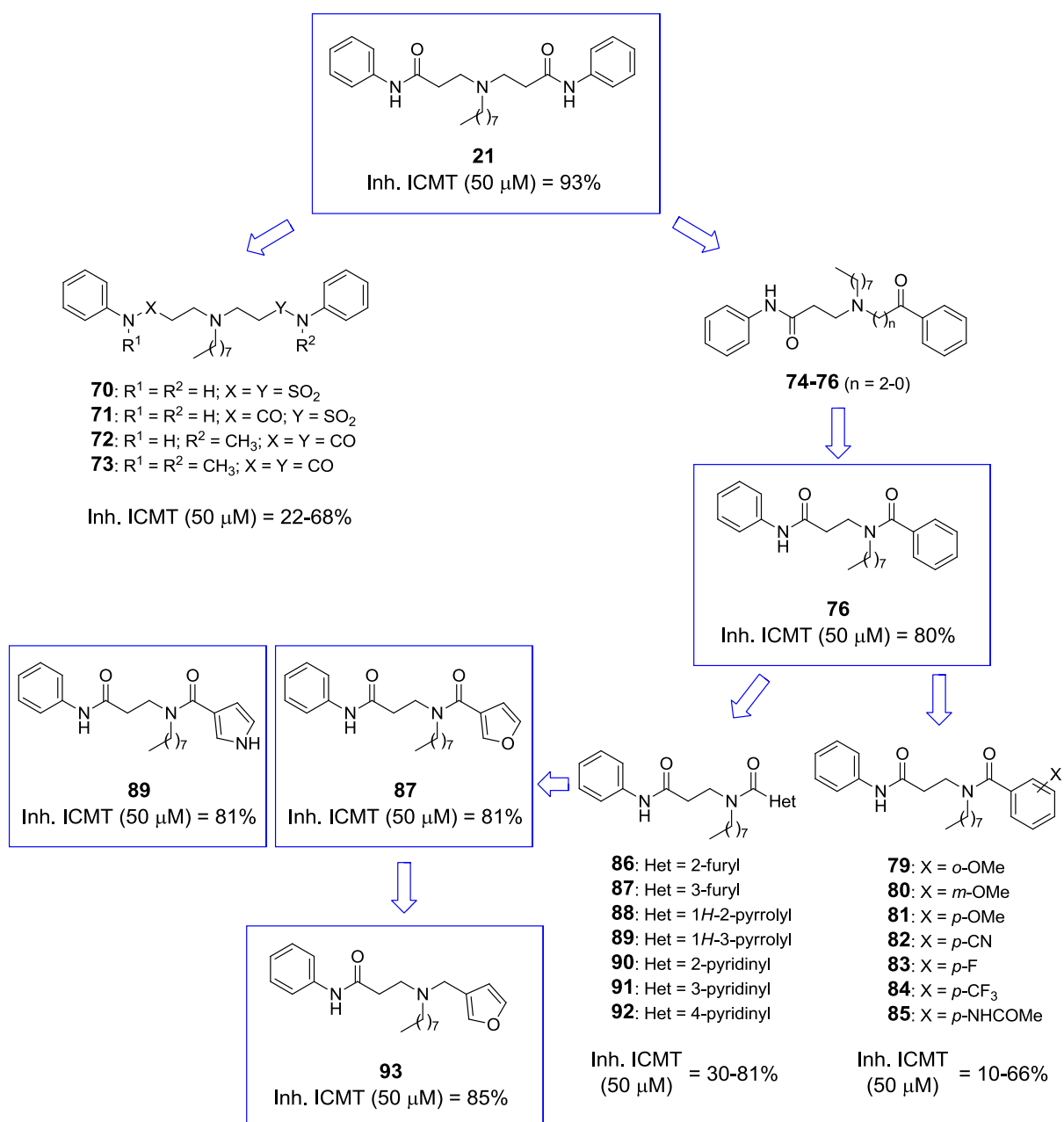


Figure 7. Modifications in the amide group of compound **21**.

3.3. Evaluation of the cytotoxicity of the most potent ICMT inhibitors

In order to determine whether any of the identified ICMT inhibitors could be a candidate for the treatment of progeria or act as an antitumor compound, we selected those with an ICMT inhibition higher than 80% at 50 μ M and we determined their cytotoxicity in breast (MDA-MB-231 and MCF7) and prostate (PC-3) cancer cells. For application in cancer, it would be desirable that the compound shows cytotoxic activity. On the contrary, a compound interesting for the treatment of progeria should not be cytotoxic. Taking into account these considerations, compounds **21 (UCM1336)** and **93 (UCM13239)** stand out among the obtained results (Table 1). On the one hand, compound **21** is the most potent ICMT inhibitor identified and, at the same time, shows a significant cytotoxicity on the three assayed cell lines. Because of that, **UCM1336** represents an excellent candidate as an anticancer compound. On the other hand, derivative **UCM13239** significantly inhibits ICMT, but it is not cytotoxic on the assayed cell lines. Hence, compound **UCM13239** could be a good candidate to be used in a model of progeria.

Table 1. Cytotoxic capacity of the selected compounds.

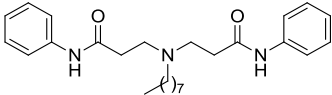
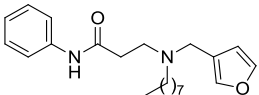
Compound	Cytotoxicity, IC ₅₀ (μM) ^a			ICMT inhibition (%) ^{a,b}
	MDA-MB-231	MCF7	PC3	
<i>Cysmethynil</i>	24	24	23	90
13	29	16	29	82
21 (UCM1336)	17	11	23	93
76	35	24	31	80
87	35	31	35	81
89	39	27	36	81
93 (UCM13239)	>50	>50	>50	85

^a The values correspond to the average of two independent experiments performed in triplicate with an associate error less than 10% in all the cases. ^b The values of ICMT inhibition were determined at a concentration 50 μM.

3.4. Pharmacokinetic in vitro profile of compounds UCM1336 and UCM13239

In order to determine if the selected compounds have also a good pharmacokinetic profile, we studied their stability in serum as well as in microsomes as an indication of hepatic metabolism. The analysis of the samples by high pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) allowed to obtain their half life time ($t_{1/2}$) (Table 2). Both compounds have moderate stability in human serum ($t_{1/2} > 90$ minutes) and also in microsomes ($t_{1/2} = 10$ and 8.4 minutes for compounds **UCM1336** and **UCM13239**, respectively), for their use in cellular models.

Table 2. Stability in serum and microsomes of **UCM1336** and **UCM13239**.

Comp.	Structure	Stability in serum ($t_{1/2}$, min) ^a		Stability in microsomes ($t_{1/2}$, min) ^a	
		Human	Mouse	Human	Mouse
UCM1336		> 90	45 ± 8	10 ± 1	8 ± 1
UCM13239		> 90	32 ± 4	8.4 ± 0.5	11 ± 2

^a The values correspond to the average ± STD of two independent experiments performed in duplicate.

3.5. Study of the antitumor potential of compound **UCM1336**

The antitumor mechanism of an ICMT inhibitor is based on the inactivation of Ras, by impairing its location in the plasma membrane and therefore decreasing the active Ras (Ras-GTP) levels, responsible for the stimulation of the proliferative pathways. Thus, in order to study the influence of the treatment with an ICMT inhibitor in the location of Ras, we incubated PC-3 tumor cells with increasing concentrations of compound **UCM1336** or cysmethynil for 96 hours. The obtained results show that in control cells Ras is located in the plasma membrane (Figure 8), while the treatment with compound **UCM1336** produces the mislocalization of Ras in the cytoplasm (Figure 8, 1-10 μM). Moreover, this effect is dose-dependent and it is higher than the induced by cysmethynil at the same concentration.

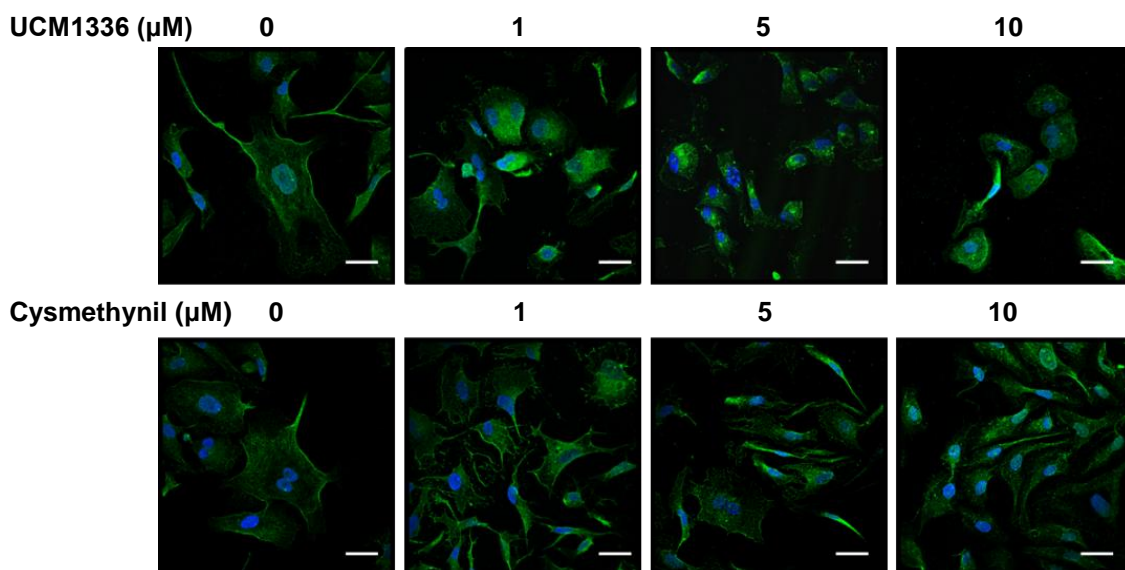


Figure 8. Compound **UCM1336** induces mislocalization of Ras from the plasma membrane to the cytoplasm in PC-3 cells in a dose-dependent manner. In the immunofluorescence images, Ras protein appears in green after labeling with a primary antibody anti-Ras followed by the corresponding secondary antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC). Nuclei (in blue) were labeled with Hoechst 33258. The images were taken in a confocal microscope under the same conditions and they correspond to the representative view of a set of 4 to 5 independent experiments. Bars, 30 μm.

Then, since the Ras activity depends on its association to the plasma membrane, we studied the ability of compound **UCM1336** to block the activation of Ras, by determining the Ras-GTP complex levels. The obtained results (Figure 9) indicate that **UCM1336** is able to significantly reduce Ras-GTP levels at 10 μM, and in higher extent than cysmethynil at 25 μM.

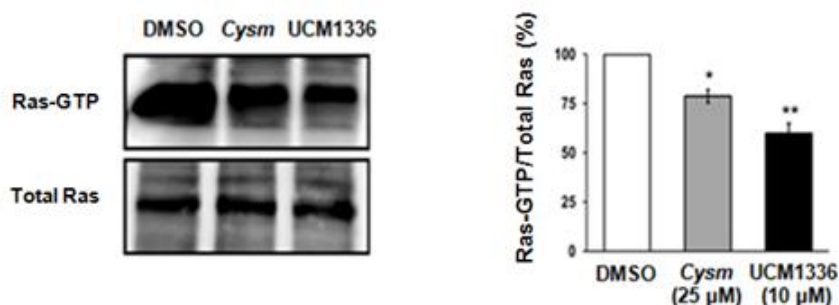


Figure 9. Compound **UCM1336** significantly reduces Ras-GTP (Ras active form) levels. Ras-GTP complex from PC-3 cells treated with DMSO, cismethynil at 25 μ M or compound **UCM1336** at 10 μ M was immunoprecipitated and visualized by western blot. The bar graph shows the ratio Ras-GTP/Total Ras, expressed as percentage relative to the DMSO assay. In all the cases, the data corresponds to the average \pm STD of three to five independent experiments; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs DMSO (Student's t test).

In sum, these results highlight the potential of ICMT inhibition as a strategy for the treatment of Ras-driven tumors and of compound **UCM1336** as an excellent candidate for this purpose.¹⁸ The study of its use in an in vivo model of cancer is currently underway in our laboratory, in collaboration with the group of Dr. Faustino Mollinedo (Centro de Investigaciones Biológicas, CIB - CSIC).

3.6. Study of compound **UCM13239** in a cellular model of progeria

Progeria is produced by the defective post-translational processing of prelamin A, which results in an increase of the hydrophobicity of the resultant protein (progerin), producing its accumulation at the inner nuclear membrane. There are evidences¹⁷ that link the location of progerin with its toxicity, and indicate that nucleoplasmatic progerin is less cytotoxic, improving the viability of progeroid cells. Hence, we studied the influence of the treatment with compound **UCM13239** in the progeroid cell line of fibroblasts AF3 with the mutation $Lmna^{G609G/G609G}$, responsible for the progerin production. In first place, we checked that derivative **UCM13239** does not show a cytotoxic behavior in this cell line. Then, we incubated the progeroid cells in presence of compound **UCM13239** for 24 hours, and we visualized progerin using an antibody that recognizes its carboxyl terminus. The obtained results (Figure 10) show that in healthy AF3 fibroblasts (without the mutation

Summary

Lmna^{G609G/G609G}), there is not prelamin A because it has been correctly processed to lamin A; on the contrary, in Lmna^{G609G/G609G} AF3 fibroblasts, progerin is accumulated in the inner nuclear membrane. This accumulation is reduced in cells treated with compound **UCM13239**, which favors the mislocalization of progerin in the nucleoplasm (Figure 10).

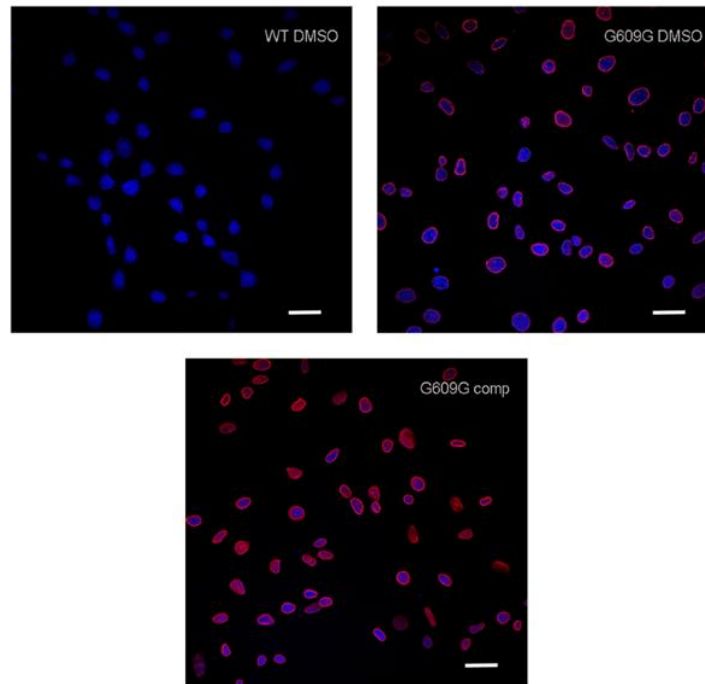


Figure 10. Images of the nuclei obtained by confocal microscopy after the treatment of AF3 fibroblasts with the ICMT inhibitor **UCM13239** (25 μ M). Prelamin A (in red) is absent in healthy fibroblasts (WT, upper left image), and accumulates at the nuclear inner membrane in AF3 Lmna^{G609G/G609G} fibroblasts treated with DMSO (upper right image). This accumulation is reduced in AF3 Lmna^{G609G/G609G} fibroblasts treated with 25 μ M of compound **UCM13239** (bottom image). The nuclei (in blue) were labeled with Hoechst 33258. Representative images from three independent experiments performed in triplicate are shown. Bars, 20 μ m.

Then, we confirmed that compound **UCM13239** increases the cellular viability of progeroid cells as it is shown in the growth curve obtained after 7 days (Figure 11) and that it stimulates cellular proliferation pathways as reflected in the increase of phosphorylated levels of the AKT protein (Figure 12).

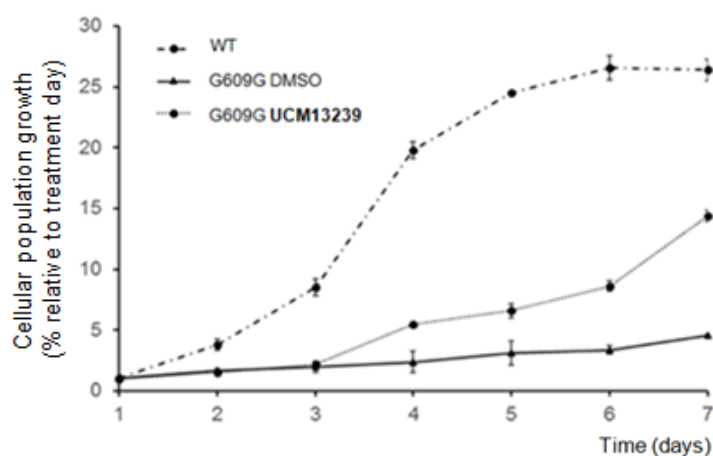


Figure 11. Growth curve of AF3 WT fibroblasts and AF3 Lmna^{G609G/G609G} fibroblasts treated with DMSO or 25 μM of compound **UCM13239**.

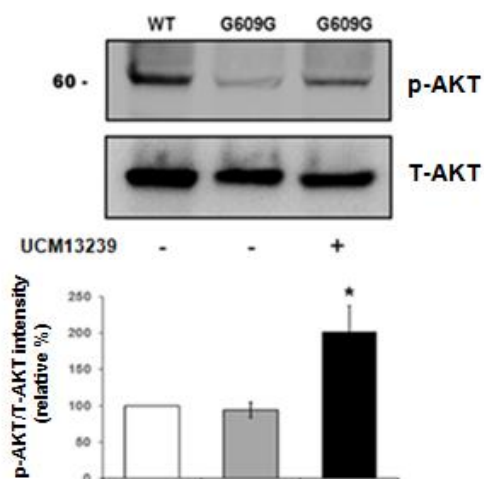
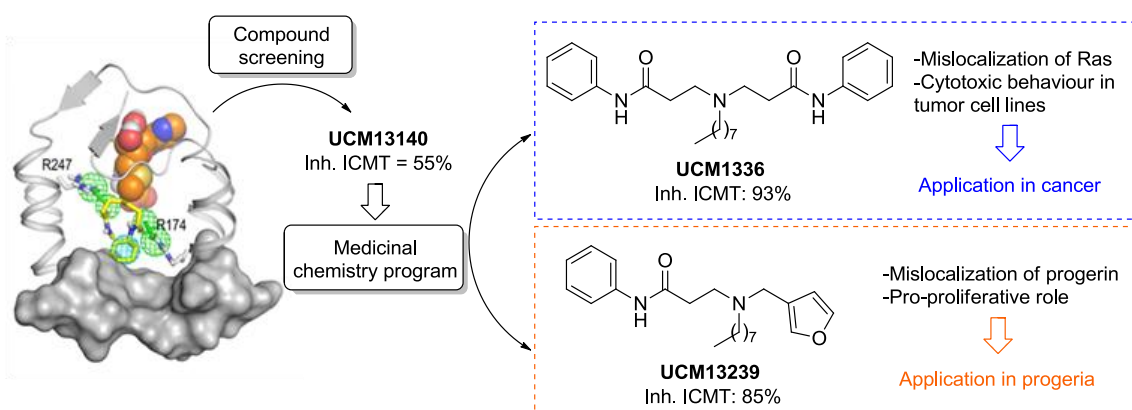


Figure 12. Representative western blot assays corresponding to the p-AKT and total AKT (T-AKT) levels in AF3 WT fibroblasts and AF3 Lmna^{G609G/G609G} fibroblasts treated with DMSO or **UCM13239** (25 μM). The bars graph corresponds to the p-AKT intensity relative to T-AKT in each case. *, P < 0.05 (Student's t test). The data correspond to the average ± STD of three independent experiments performed in triplicate.

The obtained results support the importance of the ICMT inhibition as a promising approach for the development of drugs to treat progeria, and the suitability of **UCM13239** as a good starting point for the development of new strategies to find a cure for this disease.

4. CONCLUSIONS

The results obtained in this work highlight the importance of inhibiting the enzyme ICMT as a novel approach for the development of efficacious drugs to treat cancer and progeria, and they allow the validation of this enzyme as a therapeutic target for the treatment of these diseases. The elaboration of a structure-based pharmacophore model and the subsequent in-house library screening process, led us to the identification of a hit (**UCM13140**) in the search for new ICMT inhibitors. The structure-activity relationship studies carried out allowed the characterization of a series of ICMT inhibitors. Among them, compounds **UCM1336** and **UCM13239**, which are able to block 93% and 85% of the ICMT activity at 50 μ M, respectively, stand out. On the one hand, the excellent capacity of compound **UCM1336** to mislocalize Ras from the plasma membrane, together with its cytotoxic behavior in several cancer cell lines, allow considering it as a lead that can be used in in vivo models of Ras-driven cancers. On the other hand, the efficacy of compound **UCM13239** to reduce the levels of progerin at the inner nuclear membrane, and its pro-proliferative effect in progeroid cells, make this compound an excellent starting point for the development of drugs for the treatment of progeria.



5. BIBLIOGRAPHY

1. Coleman, M. L. *et al.* RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 355-366.
2. Dechat, T. *et al.* Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 832-853.
3. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **2013**, *339*, 1546-1558.
4. Cox, A. D. *et al.* Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 828-851.
5. Eriksson, M. *et al.* Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **2003**, *423*, 293-298.
6. Wright, L. P.; Philips, M. R. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 883-891.
7. Chang, S. Y. *et al.* Inhibitors of protein geranylgeranyltransferase-I lead to prelamin A accumulation in cells by inhibiting ZMPSTE24. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1176-1182.
8. Winter-Vann, A. M. *et al.* Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 405-412.
9. Konstantinopoulos, P. *et al.* Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 541-555.
10. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11-22.
11. Whyte, D. B. *et al.* K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14459-14464.
12. Ramanujulu, P. M. *et al.* Functionalized indoleamines as potent, drug-like inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Icmt). *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 378-386.
13. Judd, W. R. *et al.* Discovery and SAR of methylated tetrahydropyranyl derivatives as inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5031-5047.
14. Ibrahim, M. X. *et al.* Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science* **2013**, *340*, 1330-1333.
15. Yang, J. *et al.* Mechanism of isoprenylcysteine carboxyl methylation from the crystal structure of the integral membrane methyltransferase ICMT. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 997-1004.

16. Diver, M. M. *et al.* Mutational analysis of the integral membrane methyltransferase isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) reveals potential substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26007-26020.
17. Scaffidi, P.; Misteli, T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 440-445.
18. Lopez-Rodriguez, M. L. *et al.* Novel inhibitors of the enzyme isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). WO2014118418A1. **2014**.

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

La superfamilia de proteínas CAAX se caracteriza por la presencia del tetrapéptido CAAX en su extremo carboxilo terminal, en el que “C” representa una cisteína, “A” corresponde a un aminoácido alifático, y “X” se refiere a cualquier aminoácido. Varias proteínas CAAX se encuentran implicadas en numerosas patologías que incluyen el cáncer¹ y la progeria.² De hecho, las proteínas Ras, las cuales se incluyen dentro de la superfamilia de proteínas CAAX, representan una de las superfamilias de oncoproteínas más importantes, encontrándose sobreexpresadas en un 30% de los procesos tumorales.^{3,4} Con respecto a la progeria (o síndrome de progeria de Hutchinson-Guilford, HGPS), es la lámina A, otra proteína perteneciente a la familia CAAX, la principal responsable del desarrollo de los síntomas de esta enfermedad.⁵

Debido a la presencia del fragmento CAAX en el extremo carboxilo terminal de su estructura, estas proteínas requieren una serie de modificaciones post-traduccionales para alcanzar su forma biológicamente activa. Así, el procesamiento post-traduccionales de Ras incluye la unión de un grupo farnesilo o geranylgeranilo a la cisteína del fragmento CAAX catalizada por las enzimas farnesiltransferasa (FTasa) o geranylgeranyltransferasa de tipo I (GGTasa I), respectivamente. A esta etapa de prenilación le sigue la proteólisis de los residuos AAX por la endoproteasa *Ras converting enzyme 1* (Rce1) y la metilación final del grupo carboxilo expuesto por la enzima isoprenilcisteína carboximetiltransferasa (ICMT).⁶ Por otra parte, la prelámina A (precursora de lámina A) solo puede ser prenilada por la enzima FTasa, y no por GGTasa I, y la ruptura proteolítica puede ser mediada tanto por la enzima Rce1 como por la proteína *zinc metalloprotease STE24* (ZMPSTE24). La carboximetilación es catalizada por la enzima ICMT y, adicionalmente, la prelámina A requiere una etapa final consistente en una segunda proteólisis regulada por la enzima ZMPSTE24.⁷

Se han abordado diferentes estrategias para la inhibición de la proteína Ras, que incluyen la inhibición directa de su actividad y la regulación de los efectores celulares

controlados por esta proteína. Sin embargo, se ha demostrado que en ausencia de cualquiera de sus modificaciones post-traduccionales Ras pierde su capacidad para inducir una transformación tumoral. Por esta razón, las enzimas que regulan el procesamiento post-traduccionales de Ras se han propuesto como dianas terapéuticas en programas de descubrimiento de fármacos.^{8,9} En este sentido, los esfuerzos iniciales se centraron en el desarrollo de inhibidores de la enzima FTasa. Sin embargo, la prometedora efectividad mostrada por estos compuestos en ensayos preclínicos no se correspondió con los resultados obtenidos en ensayos clínicos, probablemente debido a la prenilación alternativa llevada a cabo por la enzima GGTasa I.^{10,11} Este hecho provocó que la enzima ICMT ganase importancia como posible diana terapéutica en el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. En la búsqueda de inhibidores de ICMT, los derivados más potentes obtenidos hasta el momento (*cysmethynil*¹² y un derivado de tetrahidropirano,¹³ Figura 1) se han identificado mediante procesos de cribado de alto rendimiento (*high throughput screening*, HTS). Sin embargo, y a pesar de haber demostrado su eficacia *in vitro*, *cysmethynil* no representa un buen candidato a fármaco debido a su alta lipofilia, su baja solubilidad en agua y su alta afinidad por las proteínas del plasma. Por su parte, y pese a sus buenos resultados en ensayos de actividad frente a ICMT, el derivado de tetrahidropirano no presenta una actividad significativa en ensayos celulares, lo cual limita su uso como agente terapéutico.

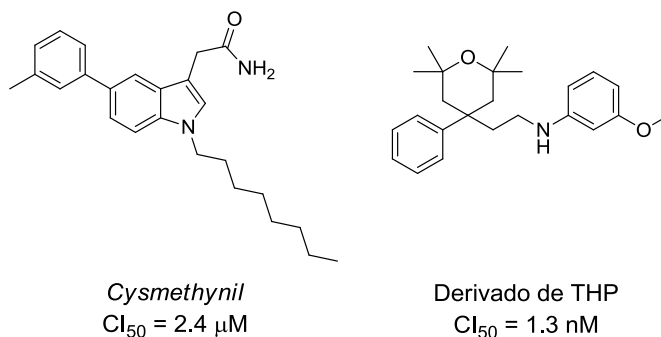


Figura 1. Inhibidores representativos de la enzima ICMT identificados mediante HTS.

Por otra parte, se han intentado diferentes estrategias para encontrar una cura para la enfermedad de progeria, incluyendo tratamientos con células madre y terapias génicas.

Sin embargo, debido a las enormes dificultades que presentan ambas aproximaciones, el interés se ha enfocado hacia la inhibición de las modificaciones post-traduccionales de la proteína prelámina A. En este sentido, estudios recientes en un modelo de progeria en ratón han demostrado la importancia del bloqueo de la actividad ICMT para el tratamiento de esta patología.¹⁴

Estos resultados ponen de manifiesto el potencial de la enzima ICMT como una aproximación prometedora en la búsqueda de fármacos antitumorales, así como para el tratamiento de la progeria.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo consiste en la identificación de inhibidores de la enzima ICMT que permitan su validación como diana terapéutica para el tratamiento del cáncer y la progeria. La consecución de este objetivo implica las siguientes etapas:

1. Identificación de nuevos *hits* capaces de inhibir la enzima ICMT.
2. Programa de química médica a partir de los *hits* identificados.
3. Caracterización biológica de los compuestos seleccionados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diseño de nuevos inhibidores de ICMT: elaboración de un modelo de farmacóforo basado en la estructura

A pesar del interés generado por la enzima ICMT en las últimas décadas, el desarrollo de nuevos inhibidores de esta proteína se ha visto dificultado por la falta de un modelo estructural y por su baja homología con otras metiltransferasas conocidas. Aunque aún no ha sido identificado el sitio de unión del sustrato a la proteína *Homo sapiens* ICMT (*Hs-ICMT*), existe un ortólogo procariota, *Methanosarcina acetivorans* ICMT (*Ma-ICMT*), que presenta un 28.4% de similitud de secuencia con esta proteína, lo que sugiere que ambas enzimas unen el cosustrato S-adenosilmetionina (SAM) de la misma forma. Teniendo en cuenta estas consideraciones, elaboramos un modelo computacional de la proteína basado en la estructura cristalográfica de *Ma-ICMT*.¹⁵ Para

ello, situamos el inhibidor *N*-acetil-*S*-farnesil-*L*-cisteína (AFC) y el cosustrato SAM en las posiciones descritas para la estructura de *Ma*-ICMT y la estabilidad de los complejos se refinó mediante simulaciones de dinámica molecular (DM). Las Figuras 2A y 2B muestran la unión de AFC a *Ma*-ICMT y *Hs*-ICMT, respectivamente. En estos modelos, el grupo carboxilo de AFC establece una interacción iónica con la Arg163 de *Ma*-ICMT (Arg247 en *Hs*-ICMT) y el grupo carbonilo amídico forma un enlace de hidrógeno con la Arg21 de *Ma*-ICMT (Arg174 en *Hs*-ICMT). A su vez, la cadena de farnesilo se expande a lo largo de la membrana a través del denominado túnel del sustrato.

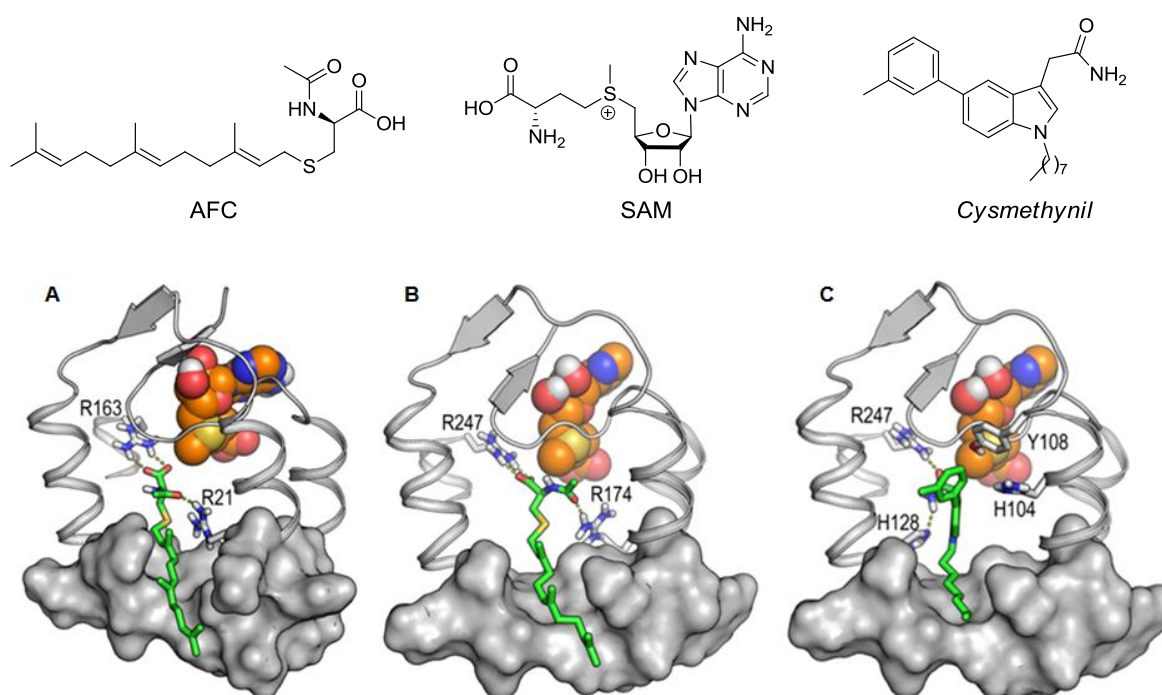


Figura 2. A. Vista representativa de la estructura de *Ma*-ICMT con el inhibidor AFC (en verde) y el cosustrato SAM (esferas) obtenida mediante simulaciones de DM. **B.** Complejo entre el modelo de homología de *Hs*-ICMT (obtenido a partir de *Ma*-ICMT) con AFC y SAM refinado por simulaciones de DM. **C.** Complejo de *Hs*-ICMT con *cysmethynil* y SAM obtenido mediante simulaciones de DM.

Los estudios de *docking* de *cysmethynil* llevados a cabo en este modelo, muestran cómo el grupo carbonilo se une a la Arg247 mediante un enlace de hidrógeno, mientras que el anillo de *m*-tolilo interacciona con la His104 y la Tyr108 (Figura 2C). A su vez, la cadena de octilo de *cysmethynil* se expande a través de la membrana de forma similar al grupo farnesilo de AFC. La importancia de la His104, la Tyr108 y la Arg247 para la unión del sustrato ha sido recientemente confirmada por un estudio de mutagénesis del ortólogo eucariota *Anopheles gambiae* ICMT (*Ag-ICMT*).¹⁶

Usando estos modelos (enzima *Hs-ICMT* con AFC y *cysmethynil*) como punto de partida, elaboramos un modelo de farmacóforo basado en la estructura (Figura 3A), el cual incluye dos grupos aceptores de enlace de hidrógeno (HBA) y una subunidad hidrofóbica (HYD). Con el modelo de farmacóforo elaborado se llevó a cabo un cribado de una selección de compuestos del Laboratorio de Química Médica de la UCM. Este proceso inicialmente nos condujo hasta **UCM1333** (Figura 3B). Sin embargo, la comparación entre las interacciones de este derivado con las correspondientes a *cysmethynil* y AFC, sugerían que la incorporación de una cadena hidrofóbica que se expandiese a través del túnel del sustrato incrementaría las interacciones entre el compuesto **UCM1333** y la enzima. Así, diseñamos el derivado **UCM13140** (Figura 4), el cual incorpora una cadena de *n*-octilo anclada a un átomo de nitrógeno. Este compuesto se estudió mediante *docking* en el modelo de farmacóforo (Figura 4), sugiriendo una capacidad de unión mayor que en el caso de **UCM1333**. Al determinar la capacidad de ambos compuestos para inhibir la enzima ICMT, observamos que **UCM1333** es capaz de bloquear la actividad ICMT con una potencia moderada (30% de inhibición a 50 μ M); mientras que **UCM13140** incrementa su potencia inhibitoria hasta el 55% a 50 μ M, por lo que este derivado fue seleccionado como *hit*.

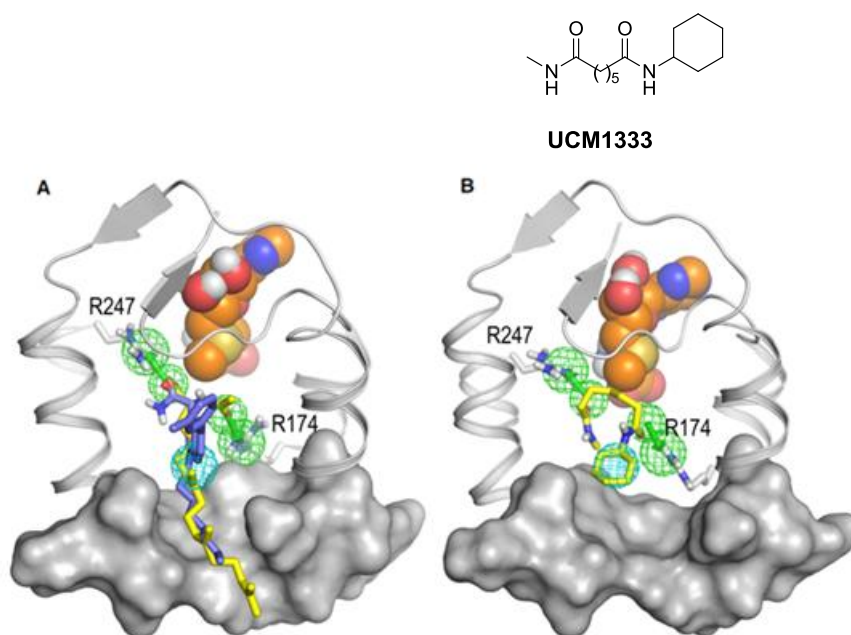


Figura 3. A. Superposición de los complejos formados por *Hs-ICMT* y AFC (en amarillo) y *cysmethynil* (en azul) obtenidos mediante simulaciones de DM. Estas simulaciones se usaron para desarrollar un modelo de farmacóforo formado por dos grupos aceptores de enlace de hidrógeno (esferas verdes y flechas) y una subunidad hidrofóbica (esfera azul). **B.** El compuesto **UCM1333** (en amarillo), procedente de la quimioteca del Laboratorio de Química Médica de la UCM, fue identificado mediante ajuste en el modelo de farmacóforo. En ambos casos, el cosustrato SAM se representa en forma de esferas.

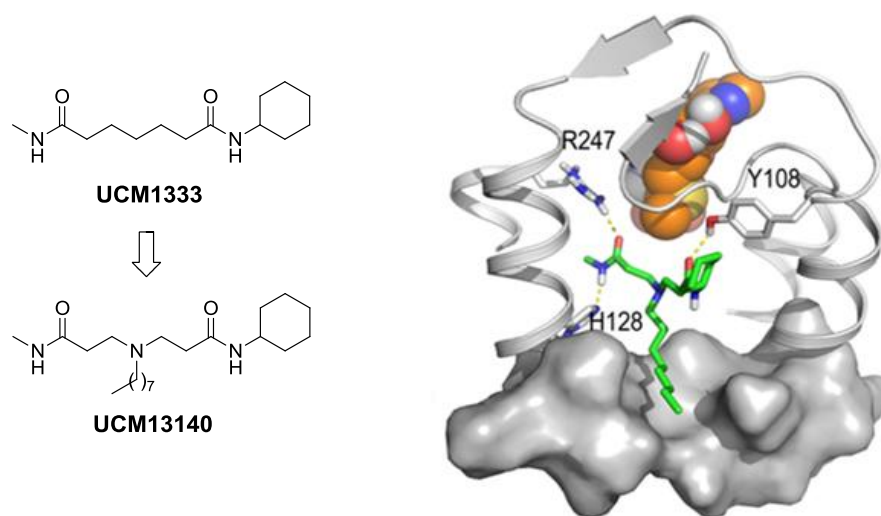


Figura 4. El compuesto **UCM13140** (en verde) presenta una cadena de *n*-octilo que puede expandirse a través de la membrana empleando el túnel del sustrato (representado como una superficie gris), de forma similar a como sucede con el residuo hidrofóbico de *cysmethynil* y AFC. El cosustrato SAM se muestra en forma de esferas.

3.2. Programa de química médica

Con el objetivo de identificar inhibidores de ICMT más potentes y con buenas propiedades farmacocinéticas, iniciamos un programa de química médica. Así, se sintetizaron los compuestos **12** y **13** (Figura 5) en los que se sustituyó el grupo metilo por una subunidad hidrofóbica (ciclohexilo) o aromática (fenilo). Su evaluación biológica permitió identificar al derivado **13** como el más potente, mostrando un excelente 82% de inhibición a 50 μM .

Una exploración más amplia del campo estructural nos llevó a sintetizar los compuestos **16-23** (Figura 5), en los cuales se mantiene la cadena de octilo y la subunidad de fenilo y se reemplaza el anillo de ciclohexilo por diferentes sustituyentes tanto alifáticos como aromáticos. La evaluación de la capacidad de estos compuestos para inhibir la enzima ICMT indicó que la mayoría de los cambios introducidos no se traducen en un aumento de la potencia inhibitoria con respecto a **UCM13140**, con la única excepción del derivado **21**, el cual exhibe un excelente 93% de inhibición a 50 μM ($\text{CI}_{50} = 2 \mu\text{M}$) y un valor aceptable de lipofilia ($\text{cLogP} = 4.1$). A partir de este compuesto se continuó

con la exploración estructural mediante la modificación de la cadena lipofílica, así como la introducción de sustituyentes en el anillo de fenilo (Figura 6).

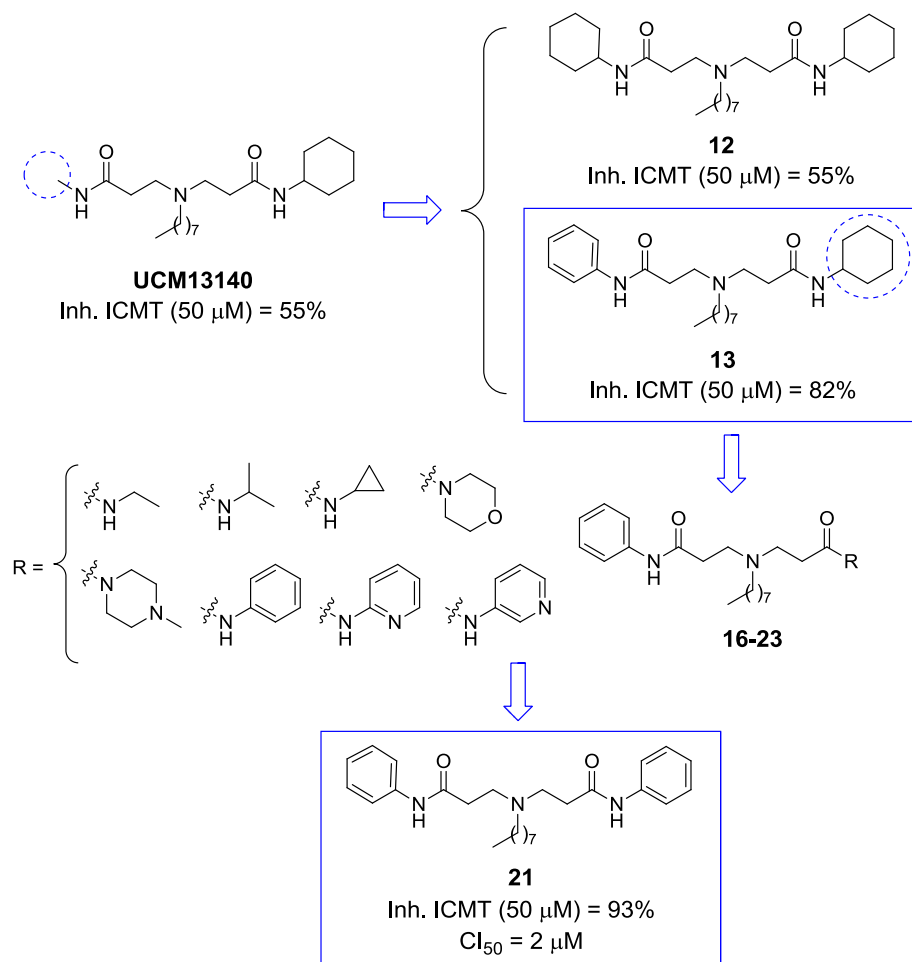


Figura 5. Modificaciones en el anillo de ciclohexilo del compuesto **13**. Identificación de **21**.

Con respecto a la cadena lipofílica se estudió su longitud óptima y se introdujeron átomos de oxígeno en dicha cadena con objeto de disminuir la lipofilia (cLogP = 0.39-3.05). Así, se sintetizaron los derivados **29-35** (Figura 6) y la determinación de su capacidad para inhibir la enzima ICMT puso de manifiesto que la cadena de *n*-octilo es un

requisito esencial para la actividad en esta serie de compuestos. En cuanto a la introducción de sustituyentes en uno de los anillos de fenilo, se sintetizaron los compuestos **45-56** (Figura 6), en los que se tuvo en cuenta tanto la posición del sustituyente como su efecto electrónico. De la evaluación de su capacidad para inhibir la enzima ICMT no se observó una correlación estructura-actividad clara, y ninguno de estos compuestos fue capaz de mejorar la potencia inhibitoria de **21** (93% de inhibición a 50 μ M).

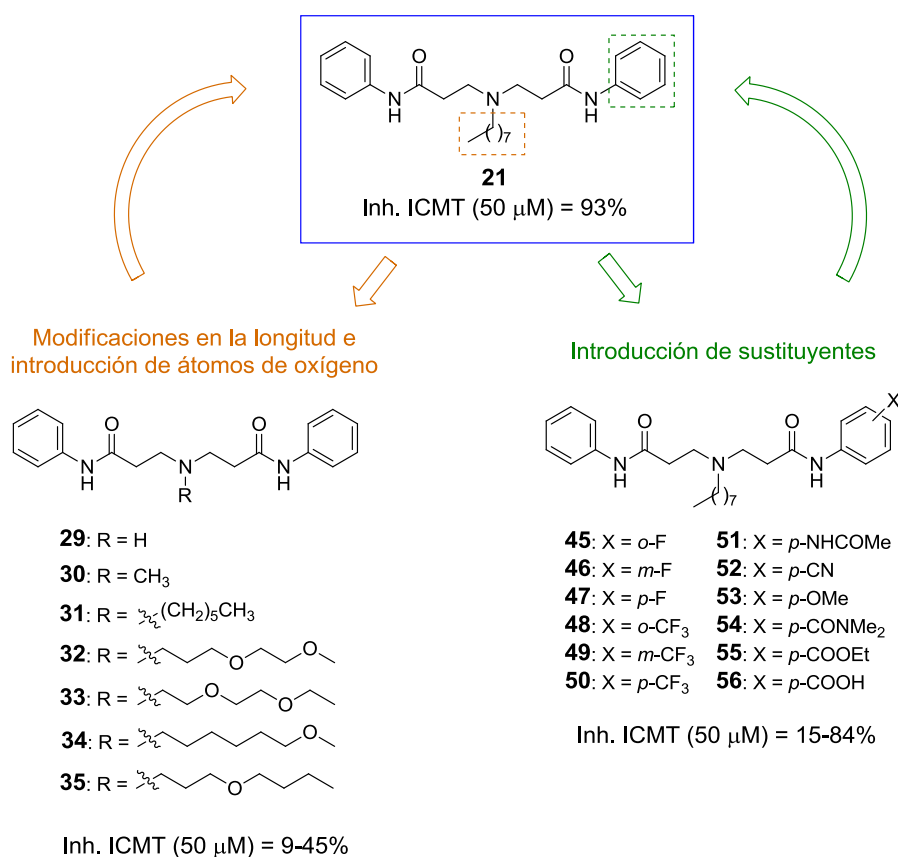


Figura 6. Modificaciones en la cadena lipofílica de **21** (compuestos **29-35**) e introducción de sustituyentes en el anillo de fenilo (compuestos **45-56**).

Continuando con los estudios de relación estructura-actividad de **21**, se consideraron diferentes modificaciones en el grupo amida de dicho compuesto (Figura 7). Así, se sustituyó el grupo amida por una sulfonamida (derivados **70** y **71**), se metiló el NH amídico (compuestos **72** y **73**) y se estudió la influencia del acortamiento del espaciador (compuestos **74-76**). Entre estas modificaciones destaca la diamida **76**, la cual es capaz de bloquear el 80% de la actividad de la enzima a una concentración 50 μM .

A partir de **76**, se sintetizaron los compuestos **79-92** (Figura 7), en los cuales se incorporaron diferentes sustituyentes en el anillo bencénico (**79-85**) o se reemplazó el grupo fenilo por sistemas heteroaromáticos (**86-92**). La determinación de la potencia inhibitoria de los compuestos **79-85** mostró que ninguna de las modificaciones estructurales introducidas consigue mejorar la inhibición del derivado **76** de partida (80% de inhibición a 50 μM). Entre los compuestos heteroaromáticos (**86-92**) destacan el derivado de furano **87** (81% de inhibición a 50 μM) y el de pirrol **89** (81% de inhibición a 50 μM). Finalmente, la reducción del grupo carbonilo de **87** permitió obtener el compuesto **93** (Figura 7) con una excelente capacidad para bloquear la actividad ICMT (85% de inhibición a 50 μM).

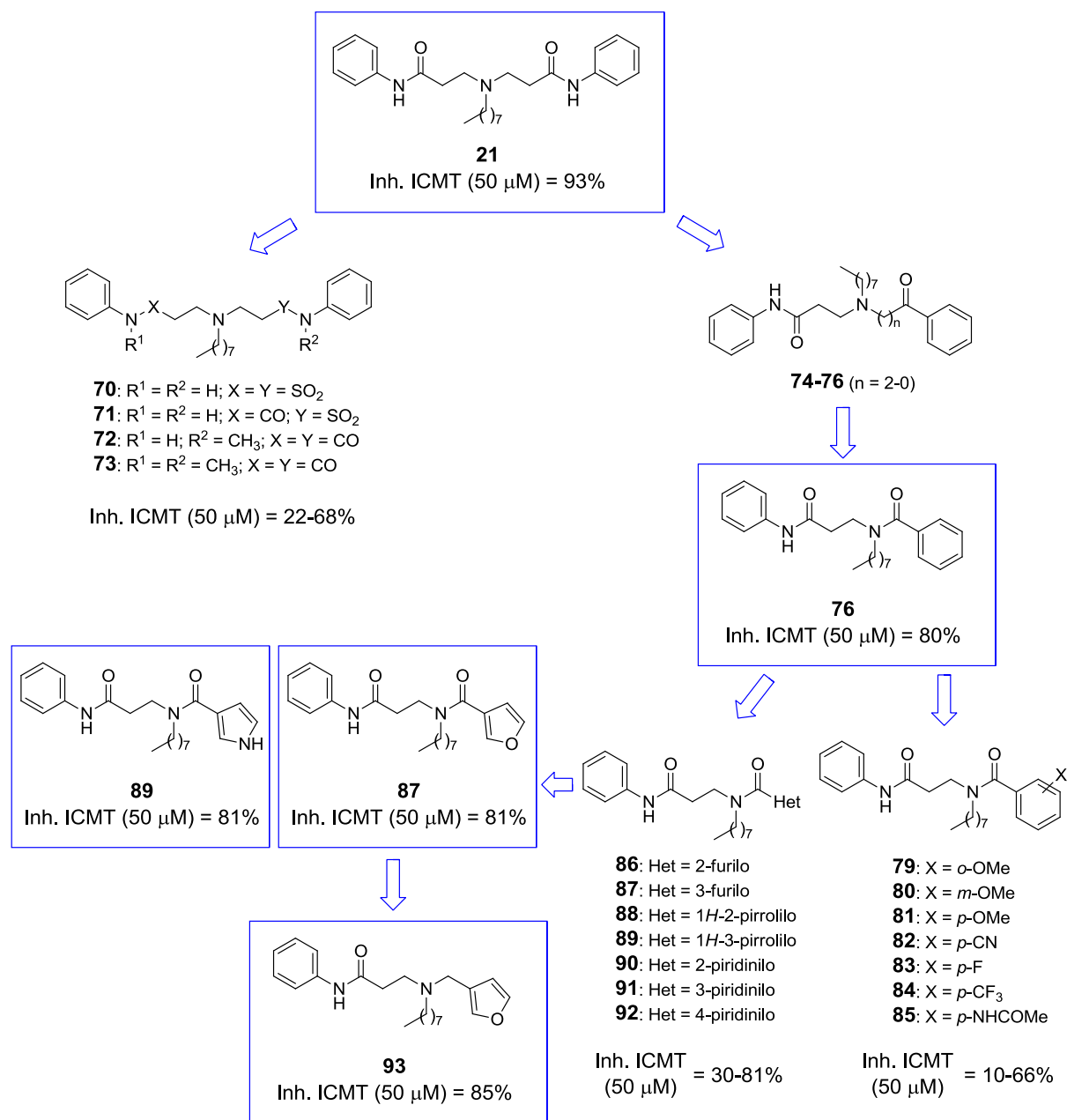


Figura 7. Modificaciones en el grupo amida del compuesto **21**.

3.3. Evaluación de la citotoxicidad de los inhibidores de ICMT más potentes

Con el objetivo de determinar si alguno de los inhibidores de ICMT identificados podía ser un candidato para el tratamiento de la progeria o actuar como un compuesto antitumoral, se seleccionaron aquellos con una inhibición de ICMT mayor del 80% a 50 μ M y se determinó su citotoxicidad en líneas tumorales de mama (MDA-MB-231 y MCF7) y próstata (PC-3). En el caso de su posible aplicación en cáncer, sería deseable que el compuesto, además de ser efectivo en la inhibición de la actividad ICMT, presentara actividad citotóxica. Por el contrario, un compuesto con interés para el tratamiento de la progeria debería ser activo en la inhibición de ICMT sin ser citotóxico. Teniendo en cuenta estas consideraciones, entre los resultados obtenidos (Tabla 1) destacan los compuestos **21 (UCM1336)** y **93 (UCM13239)**. Por una parte, el compuesto **UCM1336** resulta ser el más eficaz en la inhibición de la actividad ICMT y, al mismo tiempo, muestra una citotoxicidad significativa en las tres líneas celulares ensayadas. Por ello este compuesto representa un excelente candidato para su aplicación en el tratamiento del cáncer. Por otra parte, el compuesto **UCM13239** muestra una potencia inhibitoria igualmente destacable, pero en este caso no resulta citotóxico en las líneas celulares ensayadas. Por tanto, se consideró **UCM13239** como un buen candidato para su uso en un modelo celular de progeria.

Tabla 1. Capacidad citotóxica de los derivados seleccionados.

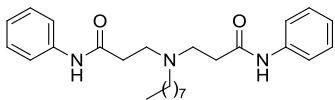
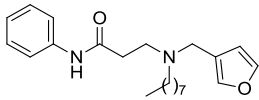
Compuesto	Citotoxicidad, CI_{50} (μM) ^a			Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
	MDA-MB-231	MCF7	PC3	
<i>Cysmethynil</i>	24	24	23	90
13	29	16	29	82
21 (UCM1336)	17	11	23	93
76	35	24	31	80
87	35	31	35	81
89	39	27	36	81
93 (UCM13239)	>50	>50	>50	85

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μM .

3.4. Perfil farmacocinético *in vitro* de los compuestos UCM1336 y UCM13239

Con el objetivo de determinar si los compuestos seleccionados presentan, además, un buen perfil farmacocinético, se estudió su estabilidad *in vitro* tanto en suero como frente al metabolismo hepático empleando microsomas como modelo de éste. En ambos casos los ensayos se realizaron con muestras humanas y de ratón. Los resultados obtenidos (Tabla 2) muestran que ambos compuestos presentan unos valores aceptables de estabilidad, con tiempos de vida media ($t_{1/2}$) en suero humano superiores a 90 minutos y entre 8 y 10 minutos en microsomas, lo que permite su empleo en modelos celulares.

Tabla 2. Estabilidad en suero y en microsomas de **UCM1336** y **UCM13239**.

Comp.	Estructura	Estabilidad en suero ($t_{1/2}$, min) ^a		Estabilidad en microsomas ($t_{1/2}$, min) ^a	
		Humano	Ratón	Humano	Ratón
UCM1336		>90	45 ± 8	10 ± 1	8 ± 1
UCM13239		> 90	32 ± 4	8.4 ± 0.5	11 ± 2

^a Los valores corresponden a la media ± DE de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

3.5. Estudio del compuesto **UCM1336** como agente antitumoral

Como se indicó en la introducción, el mecanismo de acción antitumoral de un inhibidor de la enzima ICMT se basa en que produce una inactivación de la proteína Ras impidiendo su localización en la membrana plasmática y, por tanto, disminuyendo los niveles de la forma activa de Ras (Ras-GTP), responsable de la estimulación de las vías de proliferación celular. Así, resulta fundamental estudiar si, efectivamente, el compuesto **UCM1336** impide la correcta localización de Ras en la membrana celular, así como la activación de esta proteína.

Con este objetivo, se incubaron células tumorales PC-3 con concentraciones crecientes del compuesto **UCM1336** o de *cysmethynil* durante 96 horas. Los resultados permiten observar cómo, en condiciones control sin inhibidores de la enzima ICMT, Ras se localiza en la membrana plasmática (Figura 8). Por el contrario, el tratamiento con el compuesto **UCM1336** o *cysmethynil* produce la deslocalización de Ras hacia el citoplasma (Figura 8, 1-10 μM). Además, resulta destacable el hecho de que el efecto inducido por el derivado **UCM1336** es mayor que el obtenido para el tratamiento con *cysmethynil* a la misma concentración, y el efecto se incrementa de forma dosis-dependiente.

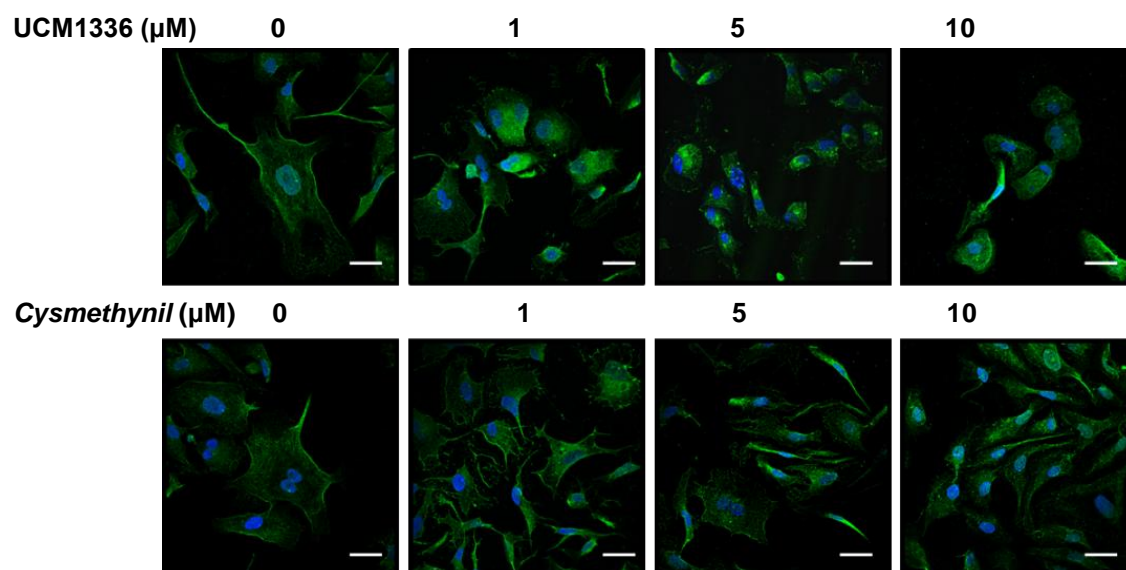


Figura 8. El compuesto **UCM1336** induce la deslocalización de Ras desde la membrana plasmática hacia el citoplasma de forma dosis-dependiente en células PC-3. En las imágenes de inmunofluorescencia la proteína Ras aparece marcada en verde tras el empleo de un anticuerpo primario anti-Ras seguido del anticuerpo secundario adecuado conjugado con isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*, FITC). Los núcleos (en azul), se marcaron con Hoechst 33258. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal bajo las mismas condiciones y se corresponden con la vista representativa de un conjunto de 3 a 5 experimentos independientes. Barras, 30 μm .

A continuación, dado que la actividad de Ras depende de su asociación a la membrana plasmática, estudiamos la capacidad del compuesto **UCM1336** para bloquear la activación de Ras, determinando los niveles del complejo Ras-GTP. En este ensayo el compuesto **UCM1336** a una concentración 10 μM fue capaz de reducir los niveles de Ras-GTP en mayor medida que *cysmethynil* a una concentración 25 μM (Figura 9).

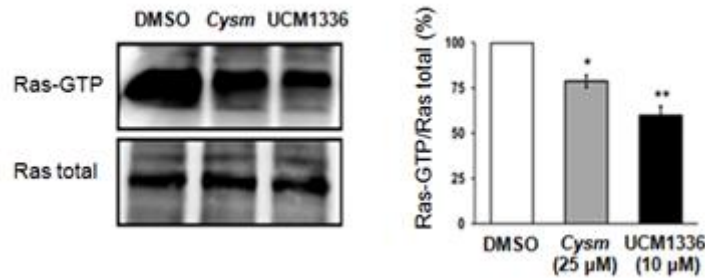


Figura 9. El compuesto **UCM1336** reduce significativamente los niveles de Ras-GTP (forma activa de Ras). El complejo Ras-GTP procedente de células PC-3 tratadas con DMSO, *cysmethynil* a una concentración 25 μM o el compuesto **UCM1336** a una concentración 10 μM fue inmunoprecipitado y visualizado por *western blot*. El diagrama de barras muestra la relación Ras-GTP/Ras total, expresada como porcentaje relativo al ensayo con DMSO. En todos los casos los datos corresponden a la media \pm DE de un total de tres a cinco experimentos independientes; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (test t de Student).

En su conjunto, estos resultados resaltan la importancia del bloqueo de la enzima ICMT como estrategia para el tratamiento de tumores dependientes de Ras. En este sentido, la eficacia en el bloqueo de la actividad ICMT y el carácter citotóxico del compuesto **UCM1336**, permiten que pueda considerarse un excelente candidato para este fin.¹⁸ Además, este derivado presenta un perfil farmacocinético aceptable, que lo convierte en un candidato susceptible de ser empleado en modelos *in vivo* de cáncer, proceso que se está llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio en colaboración con el grupo del Dr. Faustino Mollinedo del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB - CSIC).

3.6. Estudio del compuesto UCM13239 en un modelo celular de progeria

La progeria se produce debido al procesamiento post-traduccionales defectuosos de la prelámina A, lo cual implica un aumento significativo de la hidrofobicidad de la proteína resultante (progerina) y, por tanto, un incremento en su afinidad por la membrana nuclear interna, lo que favorece su acumulación. Existen evidencias¹⁷ que relacionan la toxicidad de la progerina con su localización en la membrana, e indican que la liberación de dicha proteína al nucleoplasma disminuye considerablemente su toxicidad, favoreciendo la viabilidad de las células progeroides. Por ello, se estudió la influencia del compuesto

UCM13239 en la línea de fibroblastos progeroides AF3 que portan la mutación $Lmna^{G609G/G609G}$, responsable de la producción de progerina. En primer lugar, se comprobó que el compuesto **UCM13239** no presenta un comportamiento citotóxico en esta línea celular. A continuación, las células se incubaron en presencia de **UCM13239** durante 24 horas, tras las cuales se visualizó la prelámina A (en este caso su forma mutada o progerina) con un anticuerpo que reconoce dicha proteína en su extremo carboxilo terminal. Los resultados obtenidos (Figura 10) muestran cómo en fibroblastos AF3 control sanos, es decir, que no presentan la mutación mencionada, no existe prelámina A ya que ésta ha sido correctamente procesada a lámina A; por el contrario, en fibroblastos AF3 que portan la mutación y expresan progerina, ésta se acumula en la membrana nuclear interna. Dicha acumulación se reduce en las células tratadas con el derivado **UCM13239**, en las que se produce una deslocalización de la progerina hacia el nucleoplasma (Figura 10). Este resultado pone de manifiesto la efectividad del compuesto.

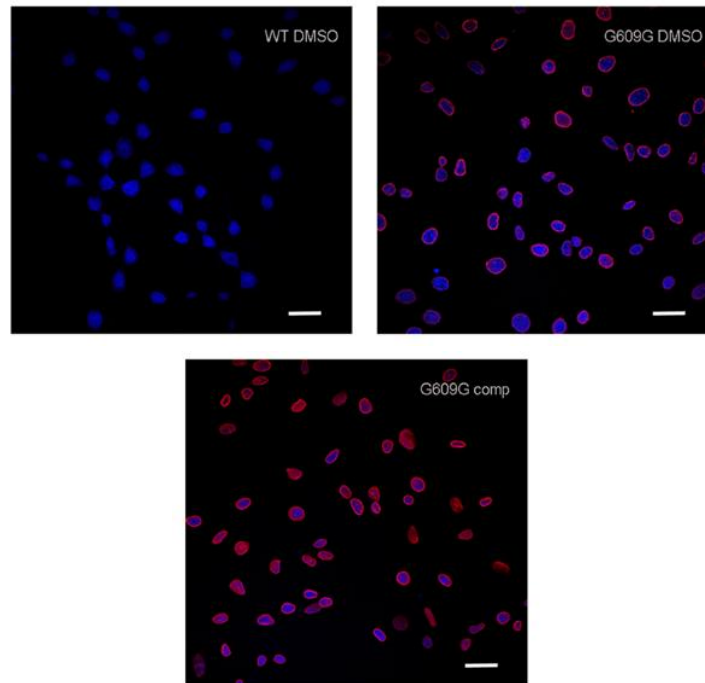


Figura 10. Imágenes de los núcleos obtenidas por microscopía confocal tras tratamiento de fibroblastos AF3 con el inhibidor de ICMT **UCM13239** (25 μ M). La prelámينا A (en rojo) no se encuentra presente en fibroblastos sanos (WT, imagen superior izquierda), y se acumula en la membrana nuclear interna en fibroblastos AF3 Lmna^{G609G/G609G} tratados con DMSO (imagen superior derecha). Esta acumulación se reduce en fibroblastos AF3 Lmna^{G609G/G609G} tratados con 25 μ M del compuesto **UCM1329** (imagen inferior). Los núcleos (en azul) se marcaron con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Barras, 20 μ m.

Seguidamente, estudiamos si el tratamiento con el compuesto **UCM13239** inducía, además, un aumento en la viabilidad celular de los fibroblastos progeroides. Para ello se realizó una curva de crecimiento celular y se estudiaron los niveles de la proteína AKT. El compuesto **UCM13239** (25 μ M) indujo un aumento en la viabilidad de las células tratadas respecto a las no tratadas (Figura 11), y produjo un incremento en los niveles de la proteína AKT fosforilada (p-AKT, Figura 12), relacionada con una estimulación de las vías de proliferación celular.

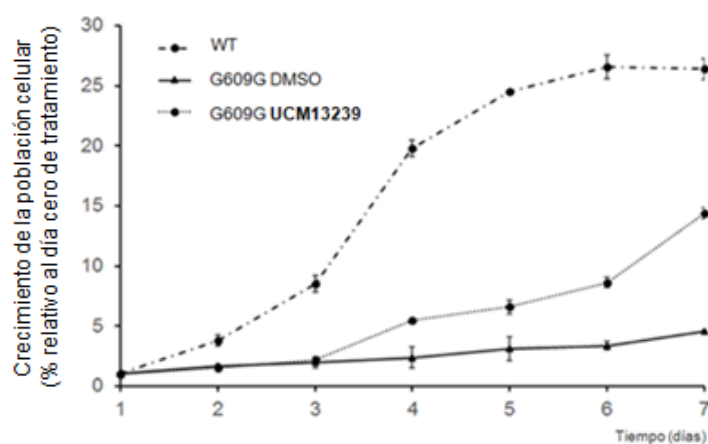


Figura 11. Curvas de crecimiento de fibroblastos AF3 WT y fibroblastos AF3 Lmna^{G609G/G609G} tratados con DMSO o una concentración 25 μ M del compuesto **UCM13239**.

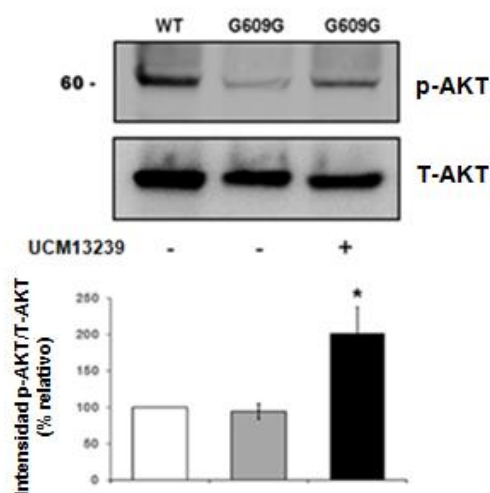
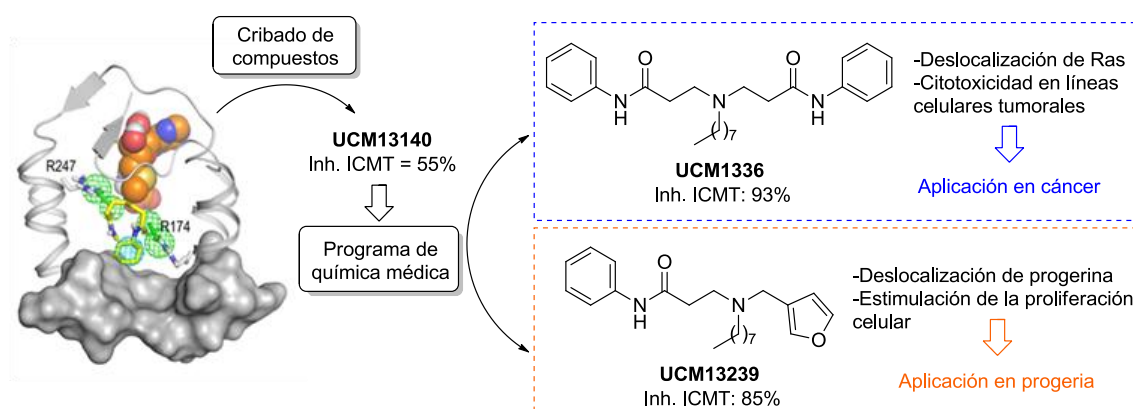


Figura 12. Ensayos de *western blot* representativos correspondientes a los niveles de p-AKT y AKT total (T-AKT) en fibroblastos AF3 WT y fibroblastos AF3 Lmna^{G609G/G609G} tratados con DMSO o **UCM13239** (25 μ M). El diagrama de barras se corresponde con la intensidad relativa de p-AKT con respecto a T-AKT en cada caso. *, $P < 0.05$ (test t de Student). Los datos corresponden a la media \pm DE de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la inhibición de la enzima ICMT como una aproximación novedosa en el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de la progeria, siendo el compuesto **UCM13239** un buen punto de partida para el desarrollo de nuevas estrategias para encontrar una cura para este tipo de enfermedad.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación resaltan la importancia de la inhibición de la enzima ICMT como una aproximación novedosa en el desarrollo de fármacos efectivos para combatir el cáncer y la progeria, y permiten la validación de esta enzima como diana terapéutica para el tratamiento de estas enfermedades. Así, la elaboración de un modelo de farmacóforo basado en la estructura y el posterior cribado de los compuestos que forman parte de la quimioteca de nuestro laboratorio, han posibilitado la identificación de un *hit* (**UCM13140**) en la búsqueda de nuevos inhibidores de la enzima ICMT. Los estudios de relación estructura-actividad han permitido caracterizar una serie de inhibidores de la enzima ICMT entre los que destacan los compuestos **UCM1336** y **UCM13239**, los cuales son capaces de bloquear el 93% y el 85% de la actividad de la enzima ICMT a una concentración 50 μ M, respectivamente. Por una parte, la excelente capacidad del compuesto **UCM1336** para deslocalizar Ras de la membrana plasmática, unido a su carácter citotóxico en varias líneas tumorales, permiten considerarlo un candidato que puede ser utilizado en modelos *in vivo* de tumores dependientes de Ras. Por otra parte, la eficacia del derivado **UCM13239** para reducir los niveles de progerina en la membrana nuclear interna junto con su capacidad para inducir la proliferación de los fibroblastos progeroides, hacen de este compuesto un excelente punto de partida para el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de la progeria. En ambos casos, estos estudios continúan llevándose a cabo en nuestro laboratorio.



5. BIBLIOGRAFÍA

1. Coleman, M. L. *et al.* RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 355-366.
2. Dechat, T. *et al.* Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 832-853.
3. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* **2013**, *339*, 1546-1558.
4. Cox, A. D. *et al.* Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 828-851.
5. Eriksson, M. *et al.* Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **2003**, *423*, 293-298.
6. Wright, L. P.; Philips, M. R. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 883-891.
7. Chang, S. Y. *et al.* Inhibitors of protein geranylgeranyltransferase-I lead to prelamin A accumulation in cells by inhibiting ZMPSTE24. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1176-1182.
8. Winter-Vann, A. M. *et al.* Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 405-412.
9. Konstantinopoulos, P. *et al.* Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 541-555.
10. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11-22.

11. Whyte, D. B. *et al.* K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14459-14464.
12. Ramanujulu, P. M. *et al.* Functionalized indoleamines as potent, drug-like inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Icmt). *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 378-386.
13. Judd, W. R. *et al.* Discovery and SAR of methylated tetrahydropyranyl derivatives as inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5031-5047.
14. Ibrahim, M. X. *et al.* Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science* **2013**, *340*, 1330-1333.
15. Yang, J. *et al.* Mechanism of isoprenylcysteine carboxyl methylation from the crystal structure of the integral membrane methyltransferase ICMT. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 997-1004.
16. Diver, M. M. *et al.* Mutational analysis of the integral membrane methyltransferase isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) reveals potential substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26007-26020.
17. Scaffidi, P.; Misteli, T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 440-445.
18. Lopez-Rodriguez, M. L. *et al.* Novel inhibitors of the enzyme isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). WO2014118418A1. **2014**.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las proteínas CAAX

Las proteínas CAAX constituyen una superfamilia de gran importancia en diferentes procesos biológicos y, además, desempeñan un papel relevante en ciertas patologías como el cáncer¹ y la progeria.² Concretamente en cáncer, las proteínas Ras pertenecientes a dicho grupo representan una de las superfamilias de oncoproteínas más importantes, estando implicadas en más del 30% de los procesos tumorales.^{3,4} Por otra parte, la localización inadecuada de otro miembro de la superfamilia CAAX, la proteína lámina A, provoca la aparición de los síntomas de la enfermedad de progeria.^{5,6}

Tanto Ras como lámina A se caracterizan por la presencia del tetrapéptido CAAX en su extremo carboxilo terminal, donde “C” representa al aminoácido cisteína, “A” corresponde a un aminoácido alifático, y “X” puede ser cualquier aminoácido. Estas proteínas sufren una serie de modificaciones post-traduccionales hasta alcanzar su forma biológicamente activa, e incluyen etapas sucesivas de prenilación, endoproteólisis y carboximetilación. Este proceso sucede de forma análoga en ambas proteínas, aunque existen algunas diferencias en cuanto a las enzimas que intervienen en el mismo.⁷⁻¹⁰ En ambos casos, dichas modificaciones dan lugar a un incremento en la hidrofobicidad de la proteína, propiciando su localización en la membrana^{11,12} (siendo ésta la membrana plasmática en el caso de la proteína Ras o la membrana nuclear interna en la lámina A). En el caso de la proteína Ras, la inserción en la membrana celular es un requisito imprescindible para la actividad, por lo que la inhibición de cualquiera de estas etapas post-traduccionales conllevará la inactivación de Ras y, por tanto, un bloqueo del proceso tumoral.

Por otro lado, la acumulación de una forma alterada de la lámina A, derivada de un procesamiento post-traduccionales defectuoso en la misma, provoca la aparición de los síntomas de la progeria. Esta proteína, denominada progerina, permanece anclada a la membrana nuclear interna en lugar de ser liberada al nucleoplasma tras su maduración

post-traducciona, como consecuencia de su elevada hidrofobicidad. De esta forma, se ha postulado que la inhibición de cualquiera de estas modificaciones implicadas en el aumento de hidrofobicidad de la progerina facilitarí la liberación de dicha proteína al nucleoplasma.

Por tanto, el bloqueo de alguna de las etapas del procesamiento post-traducciona de las proteínas Ras y lámina A podría dar lugar al desarrollo de (a) nuevos agentes antitumorales y (b) compuestos para el tratamiento del síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford.

1.2. Procesamiento post-traducciona de Ras y prelámina A

El procesamiento post-traducciona de estas proteínas tiene lugar de la siguiente forma (Figura 1):

(i) Prenilación: en la primera etapa, se produce la transferencia de un resto de naturaleza isoprenoide a la cisteína de la secuencia CAAX, a la que se une mediante un enlace tioéter. Cuando se trata de la proteína Ras este resto puede ser un grupo farnesilo o un grupo geranilgeranilo,¹³ mientras que únicamente un grupo farnesilo puede unirse a la proteína prelámina A (precursora de lámina A).^{14,15} Esta reacción es catalizada por las enzimas farnesiltransferasa (FTasa) o geranilgeraniltransferasa de tipo I (GGTasa I).

(ii) Endoproteólisis: en una segunda etapa, tiene lugar la proteólisis de los últimos tres aminoácidos del extremo carboxilo terminal (-AAX) contiguos al residuo de cisteína. Para ello, la proteína Ras prenilada migra desde el citosol hasta el retículo endoplasmático, donde se asocia a la membrana de éste insertando la cadena lipofílica isoprenoide en la bicapa de fosfolípidos. Aquí es reconocida por la endoproteasa *Ras converting enzyme 1* (Rce1), que es capaz de reconocer tanto las proteínas farnesiladas como las geranilgeraniladas¹⁶ y llevar a cabo la proteólisis del resto -AAX de la proteína.¹⁷

En el caso de la lámina A, la prelámina A farnesilada se asocia a la membrana nuclear interna mediante la inserción de la cadena isoprenoide en la misma. Allí puede ser reconocida tanto por la enzima Rce1 como por la proteasa ZMPSTE24 (*zinc metalloprotease STE24*; también conocida como *farnesylated-protein converting enzyme 1*, FACE-1, en humanos), las cuales llevan a cabo la escisión del tripéptido terminal de la secuencia CAAX.¹⁷⁻¹⁹

(iii) Carboximetilación: seguidamente se produce la metilación del extremo carboxilo terminal libre de dicha cisteína mediante una reacción de esterificación catalizada por la enzima isoprenilcisteína carboximetiltransferasa (ICMT).²⁰⁻²² Al igual que sucede con Rce1, esta enzima también se encuentra localizada tanto en la membrana del retículo endoplasmático²³ como en la membrana nuclear interna.¹⁸

(iv) En el caso de la lámina A, tiene lugar una última etapa que implica el reconocimiento de un segundo sitio de corte por la enzima ZMPSTE24, la cual lleva a cabo la proteólisis de los últimos 15 aminoácidos, liberando la lámina A ya madura al nucleoplasma.²⁴⁻²⁸

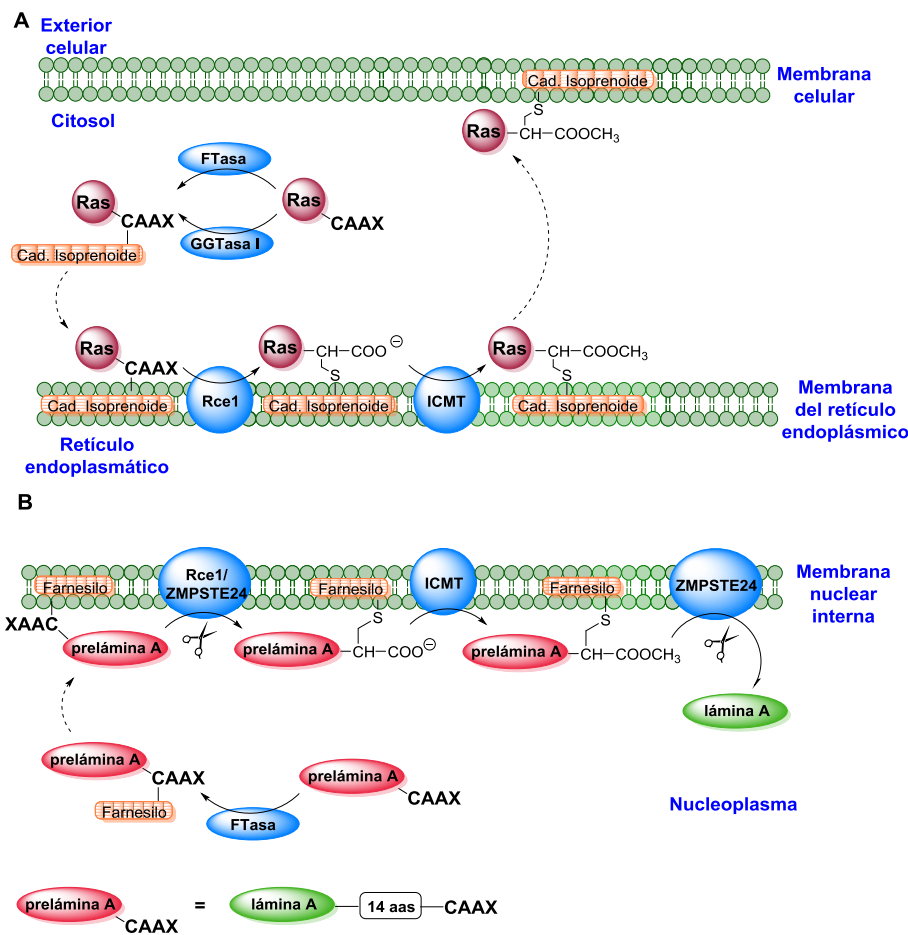


Figura 1. Esquema del procesamiento post-traduccional de las proteínas Ras (A) y lámina A (B).

1.3. Situación actual de las estrategias para la inhibición de la actividad de la proteína Ras

En la actualidad, tras más de tres décadas de investigación en la academia y la industria, no ha sido posible el desarrollo de ningún fármaco que actúe como inhibidor directo de Ras, lo que ha llevado a catalogarla como una proteína no regulable farmacológicamente (*undruggable protein*) y, por tanto, inabordable como diana terapéutica contra el cáncer. En concreto, y dado que Ras actúa como una GTPasa^{29,30} (Figura 2), se han descrito intentos para bloquear la actividad de Ras mediante el diseño de estructuras que compitieran con GDP y GTP por el sitio de unión del nucleótido a Ras.^{31,32} Sin embargo, la afinidad de Ras por GDP/GTP es muy alta (del orden de 10^{-9} - 10^{-12} M),³³ y los compuestos desarrollados mostraron una afinidad por Ras del orden micromolar, por lo que resultaron incapaces de desplazar a GTP o GDP y no se continuó con su desarrollo.

Ante esta dificultad, los esfuerzos se dirigieron al desarrollo de nuevas estructuras capaces de evitar la unión de Ras con los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs), los cuales actúan como activadores de la actividad de Ras regulando su unión a GTP (Figura 2). En este sentido, los derivados más potentes encontrados (Figura 3) fueron DCAI ($CI_{50} = 342 \mu M$)³⁴ y VU0460009 ($K_D = 240 \mu M$, 73% de inhibición a una concentración 1 mM de compuesto).³⁵ Sin embargo, la baja efectividad de los derivados interrumpió su desarrollo clínico.

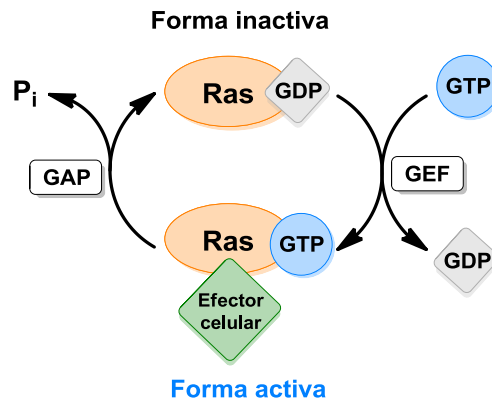


Figura 2. Ciclo de activación-inactivación de la proteína Ras.

Por otro lado, la búsqueda de inhibidores alostéricos de Ras proporcionó otras moléculas que actúan en distintos sitios de unión de la proteína. Entre las estructuras más destacadas se encuentra, por una parte, el compuesto ASCH-54292 ($CI_{50} = 0.7 \mu\text{M}$)³⁶ (Figura 3), el cual se une a Ras cerca de la región *Switch II* de la proteína; dominio clave para la interacción de Ras con los GEFs que regulan su unión a GTP.³⁷ Por otra parte, destacan los derivados IND12 ($CI_{50} = 30 \mu\text{M}$),³⁸ MCP1 ($CI_{50} < 30 \mu\text{M}$)³⁹ y Kobe 0065 ($K_i = 46 \mu\text{M}$)⁴⁰ (Figura 3), los cuales se unen al complejo Ras-GTP impidiendo su interacción con uno de los efectores celulares sobre los que actúa, la proteína Raf. Estos derivados, aunque representan una mejora en su afinidad de un orden de magnitud con respecto a los mencionados anteriormente, aún se encuentran lejos de constituir una alternativa eficaz para la inhibición de Ras.

Finalmente, una de las aproximaciones más recientes ha consistido en el desarrollo de inhibidores alostéricos de Ras particularmente selectivos para KRas^{G12C}.^{41,42} En este sentido destaca el inhibidor ARS853 ($CI_{50} = 2.5 \mu\text{M}$) (Figura 3), el cual ha demostrado su eficacia en ensayos *in vitro*. Este compuesto se une de forma selectiva a la forma mutante G12C de KRas, la mutación más frecuente de Ras en cáncer de pulmón. Además, depende para su unión de la cisteína mutante, por lo que no afecta a la proteína Ras nativa.

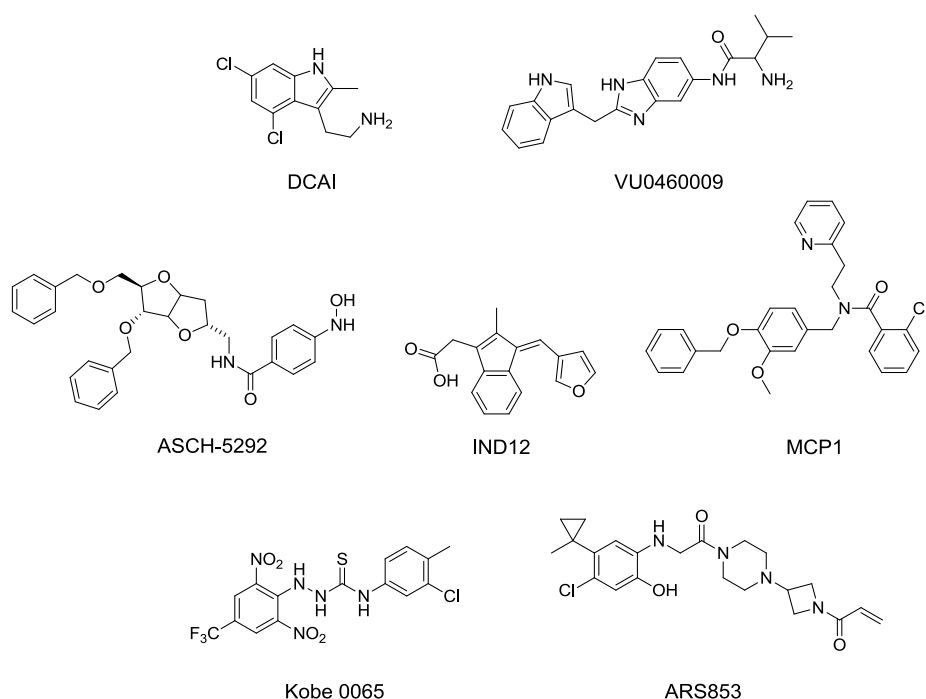


Figura 3. Inhibidores ortostéricos y alostéricos de Ras más representativos.

Puesto que la inhibición directa de Ras no ha permitido hasta la fecha el desarrollo de fármacos para su bloqueo, los esfuerzos se han centrado en la inhibición de la actividad de Ras mediante la inactivación de las enzimas que regulan su procesamiento post-traducciona

1.3.1. Inhibidores de las enzimas FTasa y GGTasa I

El descubrimiento de la importancia del proceso de prenilación en las proteínas Ras para su correcta localización celular y funcionamiento,⁴³ así como el hecho de que las tres principales proteínas Ras implicadas en oncogénesis (H-, K- y N-Ras) son sustratos de la FTasa, suscitaron el desarrollo de inhibidores de esta enzima.⁴⁴ Así, los resultados satisfactorios mostrados por algunos de estos derivados en estudios preclínicos tanto en líneas celulares tumorales como en modelos animales provocaron la inclusión de cuatro

de estos compuestos (Lonafarnib, Tipifarnib, BMS-214662 y L-778123, Figura 4) en ensayos clínicos en el año 2000.⁴⁵ Sin embargo, mientras los estudios en fases 1 y 2 resultaron prometedores, no se observó una respuesta comparable en pacientes.⁴⁶⁻⁴⁸ Esta ineficacia mostrada por los inhibidores de FTasa puede deberse a que la proteína K-Ras, la isoforma de oncoproteína Ras más frecuente en tumores, es capaz de ser geranilgeranilada por la enzima GGTasa I aun cuando se bloquea la actividad de FTasa.^{49,50} Este hecho promovió el desarrollo de inhibidores de esta enzima como una estrategia alternativa para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, únicamente el compuesto GGTI-2418 (Figura 4) se incluyó en ensayos clínicos en 2009, aunque el proyecto fue posteriormente abandonado debido a la falta de eficacia mostrada en pacientes.⁵¹ Además, dado que en conjunto FTasa y GGTasa I actúan sobre más de 300 sustratos,⁴⁵ la inhibición conjunta de ambas enzimas podría presentar serios problemas de toxicidad.

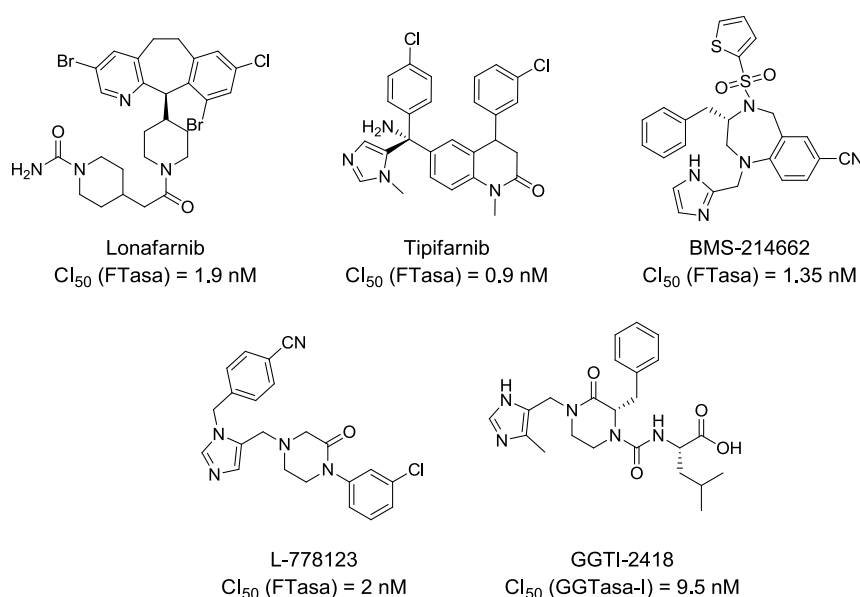


Figura 4. Inhibidores de FTasa y GGTasa I que han llegado a fases clínicas.

1.3.2. Inhibidores de la enzima Rce1

El hecho de que Rce1 sea capaz de reconocer tanto las proteínas farnesiladas como las geranilgeraniladas,¹⁶ permite esquivar el inconveniente de la prenilación alternativa de Ras por una u otra enzima. Entre los inhibidores de Rce1 destaca el derivado NSC67485 ($CI_{50} = 13 \mu\text{M}$, Figura 5), identificado mediante procesos de cribado de alto rendimiento⁵²⁻⁵⁴ (*high throughput screening*, HTS). Sin embargo, se ha observado que este compuesto forma agregados coloidales, característica común entre los inhibidores no selectivos,⁵⁵ lo cual podría dificultar su aplicación. Además, la existencia de estudios que revelan la aparición de cardiomiopatías en ratones *knockout* de la proteasa Rce1,^{56,57} junto con el hecho de que la inhibición de la enzima ICMT, la siguiente en intervenir en el procesado post-traduccional de Ras, parece inducir mayores efectos antitumorales que la inhibición de Rce1,^{58,59} hacen de la enzima ICMT una diana terapéutica más atractiva.

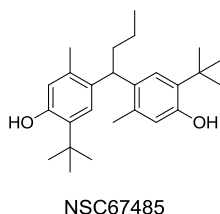


Figura 5. Inhibidor de la enzima Rce1 más destacado.

1.3.3. Inhibidores de la enzima ICMT

La búsqueda de inhibidores de la enzima ICMT comenzó con el estudio de análogos de sustrato. Sin embargo, las moléculas encontradas⁶⁰ no resultaron de interés terapéutico debido a su baja selectividad con respecto al resto de metiltransferasas celulares.^{61,62}

Por otra parte, la identificación del aminoácido cisteína modificado con un grupo prenilo como elemento estructural mínimo reconocido por la enzima ICMT, condujo al desarrollo de distintos análogos de producto, la mayoría basados en la estructura de los derivados *N*-acetil-*S*-farnesil-*L*-cisteína (AFC) y ácido farnesiltiopropiónico (FTPA),⁶³⁻⁶⁸ alcanzando los más prometedores valores de CI_{50} que oscilan entre 0.8 y 4.3 μM (Figura 6).

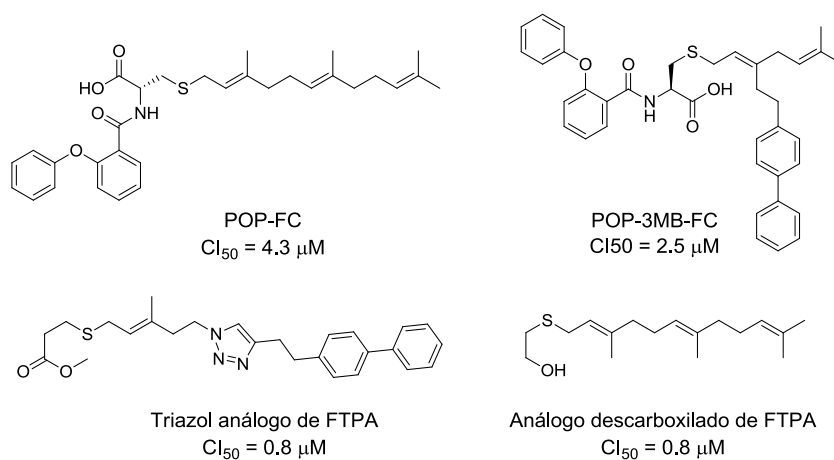


Figura 6. Análogos de producto más destacados de la enzima ICMT.

También han sido identificados, mediante HTS, diferentes inhibidores de la enzima ICMT tanto de origen natural (Figura 7A) como sintético (Figura 7B). Entre las estructuras de origen natural destacan dos derivados de una esponja marina del género *Pseudoceratina sp.*, denominados *spermatinamine* ($Cl_{50} = 1.9 \mu\text{M}$)⁶⁹ y *aplysamine 6* ($Cl_{50} = 14 \mu\text{M}$)⁷⁰, así como tres compuestos procedentes de la planta *Hovea parvicalyx* con valores de Cl_{50} entre 17 y 30 μM .

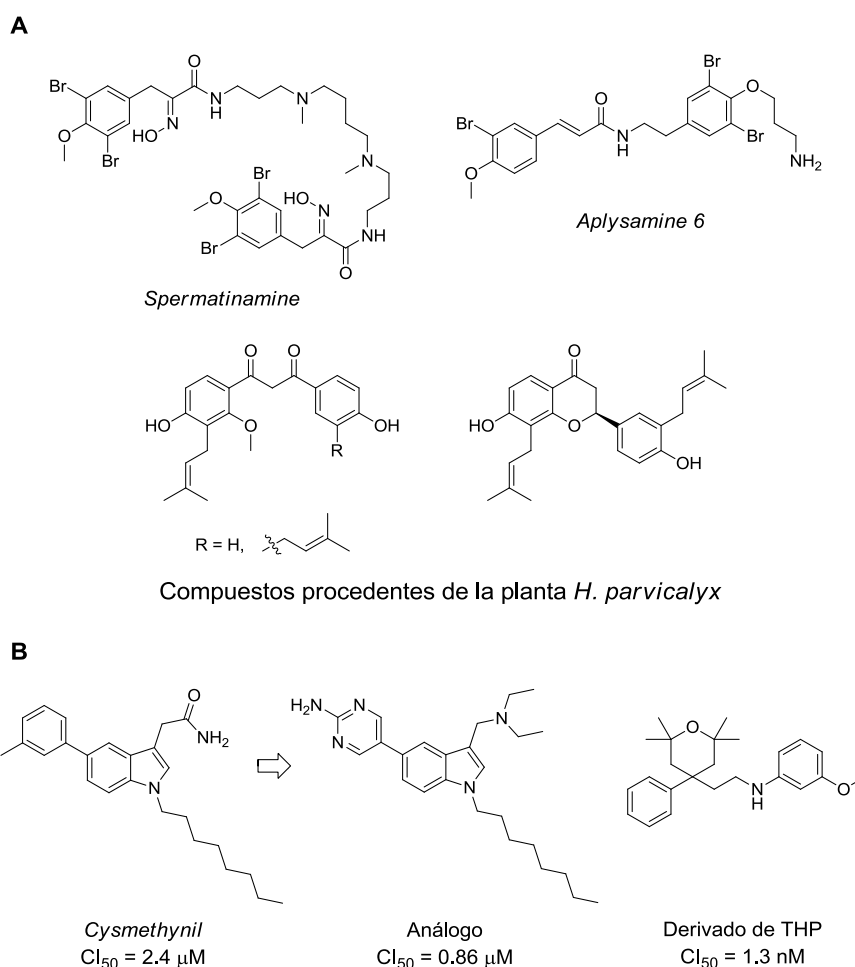


Figura 7. A. Inhibidores de la enzima ICMT de origen natural. **B.** Inhibidores representativos de la enzima ICMT de origen sintético.

Hasta la fecha, los inhibidores de la enzima ICMT más prometedores han sido identificados mediante procesos de HTS de librerías de derivados sintéticos. Entre ellos, el más estudiado hasta la fecha es el denominado *cysmethynil* ($Cl_{50} = 2.4 \mu\text{M}$, Figura 7B).^{71,72} Este compuesto, a pesar de haber demostrado su eficacia *in vitro*,^{71,73} no representa un buen candidato a fármaco debido a su alta lipofilia, su baja solubilidad en agua y su alta afinidad por las proteínas del plasma.⁷⁴ Debido a ello, se han realizado distintos estudios de relación estructura-actividad⁷⁵ (*structure-activity relationship*, SAR) que han conducido a la identificación de un derivado ($Cl_{50} = 0.86 \mu\text{M}$, Figura 7B) que

consigue una mejora significativa en sus propiedades farmacocinéticas,^{76,77} habiendo demostrado su eficacia en la muerte celular y atenuación del crecimiento tumoral *in vivo*.⁷⁸

Por último, el inhibidor de ICMT más potente descrito hasta la fecha procede de la optimización de una serie de tetrahidropiranos hallados mediante HTS. Sin embargo, a pesar de su eficacia en ensayos de actividad frente a ICMT, este compuesto ($CI_{50} = 1.3$ nM, Figura 7B)^{79,80} no presenta una actividad significativa en ensayos celulares, limitando su uso como agente terapéutico.

1.4. Situación actual en el tratamiento de la progeria

El síndrome de Hutchinson-Gilford, también conocido como progeria (*Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*, HGPS), es una enfermedad congénita letal, caracterizada por la aparición prematura de signos de envejecimiento en niños. Aunque esta patología fue descrita por J. Hutchinson⁸¹ y H. Gilford⁸² hace más de un siglo, no fue hasta 2003 cuando se establecieron las bases genéticas de la progeria.^{5,6,9} Los síntomas mostrados por los pacientes que sufren esta enfermedad afectan a sus características físicas e incluyen una apariencia de elevada edad, alopecia, ojos y orejas prominentes, labios finos y mandíbula pequeña, así como una corta estatura y bajo peso. Además de esto, los pacientes desarrollan osteolisis en falanges y clavículas, así como una progresiva arterioesclerosis en las arterias coronaria y cardiovascular que finalmente produce la muerte del 90% de los pacientes a la edad de 13 años.⁸³⁻⁸⁶

Esta enfermedad se debe a la presencia de mutaciones en el gen *LMNA*, que codifica para las proteínas prelámina A y C, ambas pertenecientes a la superfamilia CAAX. Tras un proceso de maduración post-traducciona adecuada, estas proteínas alcanzan su forma biológicamente activa, denominadas lámina A y C.² El estudio de las mutaciones del gen *LMNA* ha suscitado un gran interés, debido a que es el responsable de más de 10 enfermedades, conocidas en su conjunto como laminopatías, las cuales incluyen neuropatías, distrofia muscular, cardiomiopatías, lipodistrofias, además de otras patologías como los síndromes progeroides.⁸⁷ Ello se debe a que las láminas A, C, B1 y B2 son componentes estructurales clave de la lámina nuclear, una estructura filamentosa que se encuentra situada en la cara nucleoplasmática de la membrana nuclear interna y que es responsable de mantener la estabilidad estructural y la organización de la cromatina.⁸⁸ Además, la lámina nuclear determina la forma y el tamaño del núcleo celular, y está involucrada en la replicación y transcripción del ADN.^{89,90}

Concretamente en progeria, aproximadamente el 90% de los casos están causados por una mutación dominante en el exón 11 del gen *LMNA* denominada G608G, que implica la sustitución de una glicina codificada por el triplete GGC por una glicina codificada por el triplete GGT. Esta mutación, aparentemente silenciosa, provoca la escisión del gen *LMNA* cinco nucleótidos por encima de la mutación, produciendo la formación de un ARN mensajero (ARNm) aberrante con 150 nucleótidos menos que su análogo no mutado. Su transcripción da lugar a la creación de una forma mutada de la proteína prelámina A a la que le faltan 50 aminoácidos en su extremo carboxilo terminal, y que se denomina progerina.⁶ Resulta significativo el hecho de que la progerina también haya sido hallada en pacientes sanos y sus niveles se incrementan con la edad, lo que sugiere un mecanismo genético similar entre el desarrollo de la progeria y el proceso fisiológico de envejecimiento.^{91,92}

Esta mutación tiene una gran relevancia en el proceso de modificación post-traducciona l de la prelámina A. Así, en condiciones normales, esta proteína sufre un procesamiento post-traducciona l que afecta a la secuencia CAAX en su extremo carboxilo terminal, y que consta de etapas sucesivas de farnesilación, escisión del tripéptido -AAX, metilación del grupo carboxilo terminal libre y por último, una segunda proteólisis en la que se retiran los últimos 15 aminoácidos de la proteína (Figura 1, página 51), liberando la lámina A madura al nucleoplasma.^{9,19} En progeria, las tres primeras etapas tienen lugar sin problemas, mientras que la cuarta etapa del procesado post-traducciona l no puede llevarse a cabo debido a que la mutación G608G elimina el segundo sitio de proteólisis reconocido por la enzima ZMPSTE24, dando lugar a la progerina, que se encuentra permanentemente farnesilada y metilada, y tiene un total de 15 aminoácidos más en el extremo carboxilo terminal.⁹³ Como consecuencia de ello, esta proteína posee una alta afinidad por la membrana nuclear, lo que produce su acumulación en la misma, provocando la aparición de núcleos con forma y tamaño alterados.^{94,95}

Aunque en la actualidad la progeria continúa siendo una enfermedad incurable, sí se han hecho diversos intentos por conseguir tratamientos para esta patología.⁹⁶ Así, se han propuesto distintas vías de actuación, que incluyen tratamientos con células madre, terapias de tipo génico (tanto a nivel de ADN como de ARN) y aquellas que suponen el bloqueo de alguna de las modificaciones post-traduccionales de la prelámina A.

1.4.1. Tratamientos con células madre

Se ha demostrado que varias de las alteraciones observadas en progeria están relacionadas con la disfunción de células madre.^{97,98} Concretamente, se ha observado que la progerina afecta a la multipotencialidad y diferenciación de las células madre mesenquimales.⁹⁹⁻¹⁰¹ En consecuencia, se ha planteado la posibilidad de realizar terapias basadas en la sustitución de tejidos utilizando células madre. Sin embargo, dado que se trata de una enfermedad sistémica, esta estrategia presenta importantes desafíos prácticos debido a los numerosos tejidos afectados.

1.4.2. Terapias génicas

Debido a que los efectos producidos por la progerina no pueden ser compensados mediante la introducción de lámina A nativa y funcional, otra de las estrategias propuestas para el tratamiento de la progeria se centra en la corrección genética. Sin embargo, si bien ha sido demostrada su validez como prueba de concepto¹⁰² y podría ser aplicada en ensayos *ex vivo*, la realización de ensayos *in vivo* presentaría enormes limitaciones. Por otra parte, dado que la aparición de la progeria se debe a la activación de un sitio de corte alternativo que da lugar a una cadena de ARNm aberrante, una estrategia alternativa consiste en la inactivación de dicho sitio de corte por un oligonucleótido complementario,⁹⁵ estrategia que ha demostrado su eficacia en un modelo de progeria de ratón.¹⁰³ Además, otra metodología empleada dentro de esta aproximación comprende la eliminación del ARNm que da lugar a la progerina, utilizando para ello RNAs interferentes (siRNAs).¹⁰⁴ A pesar del gran reto que representan, en la actualidad continúa el desarrollo de terapias génicas como tratamiento para la progeria.¹⁰⁵

1.4.3. Bloqueo de las modificaciones post-traduccionales de la prelámina A

Ante la gran dificultad y, en algunos casos, falta de eficacia asociadas al resto de estrategias para el tratamiento de la progeria, en la actualidad los esfuerzos se centran en la inhibición de las modificaciones post-traduccionales de la prelámina A como estrategia principal. Así, dado que la principal anomalía que presenta la progerina es que permanece permanentemente farnesilada, inicialmente se impulsó el uso de inhibidores de FTasa como aproximación terapéutica para el tratamiento de esta patología. En este sentido, y a pesar de la obtención de algunos resultados adversos por parte de algunos derivados,¹⁰⁶ el tratamiento con lonafarnib (Figura 4) en combinación con ácido zoledrónico y pravastatina ha alcanzado los ensayos clínicos de fase 2, los cuales se espera que finalicen en el año 2017.^{107,108}

Por otro lado, la falta de actividad de la proteasa ZMPSTE24, bien debido a su inhibición^{10,109} o bien debido a la falta del sitio de corte necesario en la prelámina A, provoca la aparición de la progeria. Es más, la inactivación genética de esta proteína es a menudo empleada para generar modelos celulares y animales de progeria.^{27,110} Por tanto, el desarrollo de inhibidores de ZMPSTE24 no supone una estrategia válida para el tratamiento de esta enfermedad. Además, se ha demostrado que esta enzima interviene en el metabolismo de ácidos grasos y la síntesis de esteroides, por lo que su inhibición provoca, por una parte, la aparición de lipodistrofias¹¹¹ y por otra, la activación de procesos de autofagia.¹¹⁰

Por tanto, en los últimos años ha cobrado importancia la posibilidad de bloquear la actividad de la enzima ICMT como aproximación terapéutica para el tratamiento de la progeria. Sin embargo, resultaría lógico pensar que la variación entre la forma carboximetilada de la prelámina A y aquella que no lo está no es suficientemente significativa para conllevar su inclusión o no en la membrana nuclear interna. Este hecho, si bien no ha sido demostrado en el caso de la prelámina A, sí sucede en las isoformas RalA y RalB, dos proteínas CAAX pertenecientes a la superfamilia Ras. En ambas enzimas, las cuales presentan una estructura y propiedades bioquímicas esencialmente idénticas, la sola inhibición de la actividad ICMT resulta determinante para su localización subcelular.¹¹² De acuerdo con esta hipótesis, un reciente estudio demuestra que el bloqueo genético de ICMT en un modelo progeroide en ratones produce la deslocalización de la progerina de la membrana nuclear, observándose además una mejora de los síntomas fisiológicos producidos por la enfermedad.¹¹³

PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

De todo lo expuesto anteriormente se deduce la importancia de la enzima ICMT en las enfermedades de cáncer y progeria; y se propone, por tanto, como una posible diana terapéutica para el tratamiento de estas patologías. Así, el desarrollo de inhibidores de esta enzima potentes, selectivos y con un buen perfil farmacocinético representa el principal objetivo del presente trabajo de investigación. Este objetivo se abordará mediante las siguientes etapas:

1. Identificación de *hits* que actúen como inhibidores de la enzima ICMT.
2. Programa de química médica a partir de los *hits* identificados.
3. Caracterización biológica de los compuestos seleccionados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Diseño de nuevos inhibidores de la enzima ICMT: elaboración de un modelo de farmacóforo basado en la estructura

A pesar del interés suscitado por la enzima ICMT en las últimas décadas, el desarrollo de inhibidores de esta proteína se ha visto dificultado por su falta de homología con otras metiltransferasas de mamíferos,²¹ así como por la ausencia de modelos estructurales de la misma. Los estudios realizados en este sentido sugieren que la enzima ICMT humana (*Homo sapiens* ICMT, *Hs-ICMT*) contiene 8 hélices transmembrana, mientras que sus ortólogos procariotas y vegetales contienen 6 y 5 hélices transmembrana, respectivamente.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Sin embargo, y aunque la conservación de la secuencia entre los miembros de esta familia de proteínas es alta en las 6 hélices transmembrana próximas al extremo carboxilo terminal,^{114,115,117} el sitio de unión al sustrato en la *Hs-ICMT* no ha sido identificado aún. A pesar de ello, sí ha sido descrita la estructura cristalográfica de un ortólogo procariota de ICMT (*Methanosarcina acetivorans* ICMT, *Ma-ICMT*) unido al cosustrato S-adenosil-L-metionina (SAM), que actúa como donador de grupos metilo en la reacción catalizada por la enzima; estos estudios ponen de manifiesto la existencia de un 28,4% de similitud de secuencia con *Hs-ICMT* en dos de sus hélices transmembrana próximas a la región del extremo carboxilo terminal (correspondientes a las hélices transmembrana 7 y 8 de *Hs-ICMT*, Figura 8), lo que sugiere que ambas enzimas unen el cosustrato SAM de manera similar.¹¹⁷

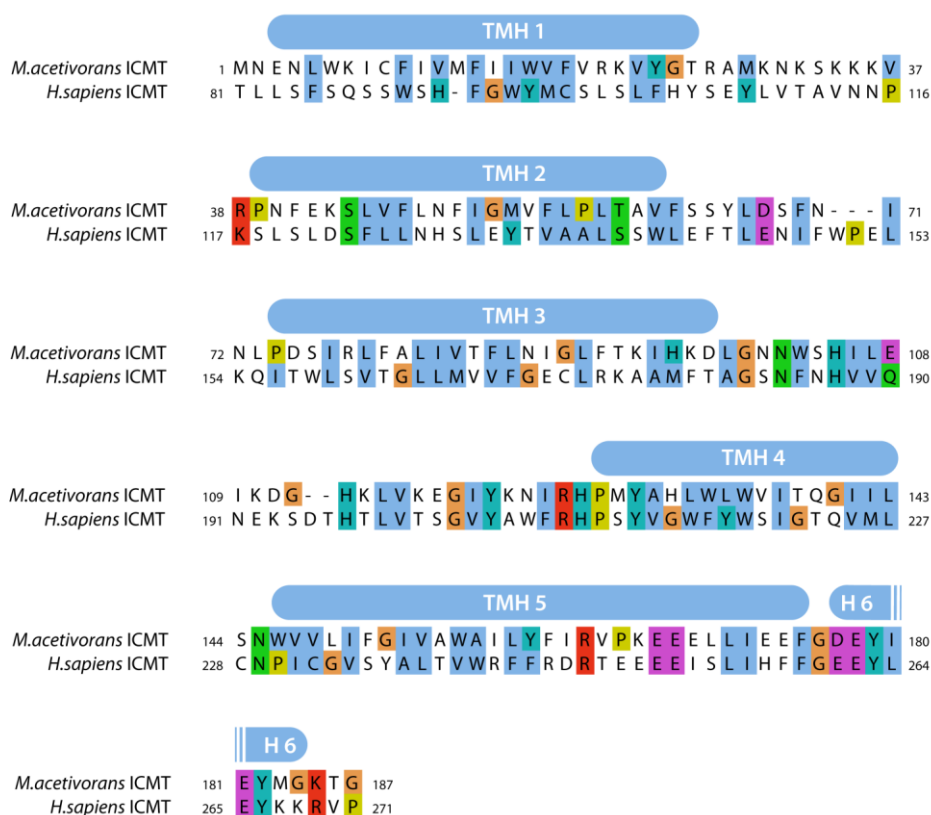


Figura 8. Alineación de secuencias de *Hs*-ICMT y *Ma*-ICMT (H, hélice; TMH, hélice transmembrana).

Teniendo en cuenta estas consideraciones se elaboró, en colaboración con el grupo del Profesor Leonardo Pardo de la Universidad Autónoma de Barcelona, un modelo computacional de la enzima *Hs*-ICMT a partir de la estructura cristalográfica del ortólogo procariota *Ma*-ICMT.¹¹⁷ En el modelo propuesto, el inhibidor *N*-acetil-*S*-farnesil-*L*-cisteína (AFC) y el cosustrato SAM se situaron en el lugar de unión equivalente al descrito para la enzima *Ma*-ICMT,¹¹⁷ y la estabilidad de los complejos, así como la estructura tridimensional del modelo resultante de *Hs*-ICMT, se estudiaron mediante simulaciones de dinámica molecular (DM). En las Figuras 9A y 9B se muestra la unión de AFC a *Ma*-ICMT y a *Hs*-ICMT, respectivamente. En ellas se observa como el grupo carboxilo de AFC establece una interacción de tipo iónico con la Arg163 de *Ma*-ICMT (equivalente a la

Arg247 de *Hs*-ICMT), mientras que el grupo carbonilo amídico forma un enlace de hidrógeno con la Arg21 en el caso de *Ma*-ICMT o la Arg174 en la enzima *Hs*-ICMT. A su vez, la cadena de farnesilo se expande a lo largo de la membrana a través del denominado túnel del sustrato.

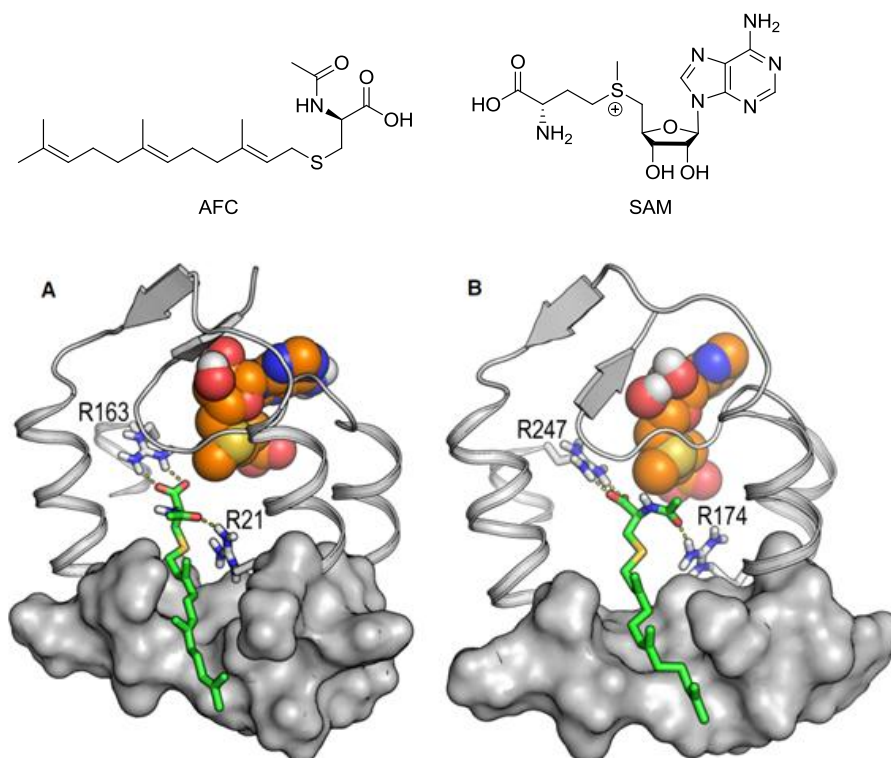


Figura 9. A. Vista representativa de la estructura de *Ma*-ICMT con el inhibidor AFC (en verde) y el cosustrato SAM (esferas) obtenida mediante simulaciones de DM. **B.** Complejo entre el modelo de homología de *Hs*-ICMT (obtenido a partir de *Ma*-ICMT) con AFC y SAM refinado por simulaciones de DM.

Empleando este modelo, se llevó a cabo el *docking* del compuesto *cysmethynil*, observándose que el grupo carbonilo amídico de este derivado forma un enlace de hidrógeno con la Arg247 (Figura 10). Por otro lado, la cadena de octilo de *cysmethynil* se

expande a través de la membrana de una forma similar al grupo farnesilo de AFC, mientras que el grupo *m*-tolilo interacciona con la His104 y la Tyr108 (Figura 10).

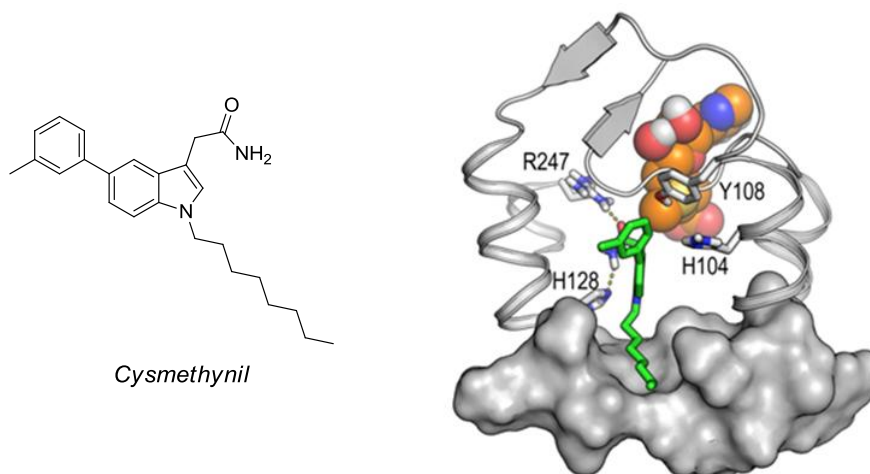


Figura 10. Vista representativa del complejo de *Hs*-ICMT con *cysmethynil* obtenida mediante simulaciones de DM.

Este modelo está de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios de mutagénesis¹¹⁶ en los cuales se ha confirmado experimentalmente la importancia de los residuos implicados en la unión del sustrato a la proteína. Así, empleando como modelo la enzima ICMT de *Anopheles gambiae* (*Ag*-ICMT), un ortólogo eucariota de *Hs*-ICMT que comparte un 51% de similitud de secuencia con ella y una longitud total similar, se han identificado 62 aminoácidos cuya mutación implica una disminución significativa de la actividad de la enzima. Entre los aminoácidos identificados destacan la His103, la Tyr107 y la Arg246 de *Ag*-ICMT (correspondientes a la His104, la Tyr108 y la Arg247 de *Hs*-ICMT) para la unión del sustrato (Figura 11),¹¹⁶ resultados que apoyan el modelo propuesto.

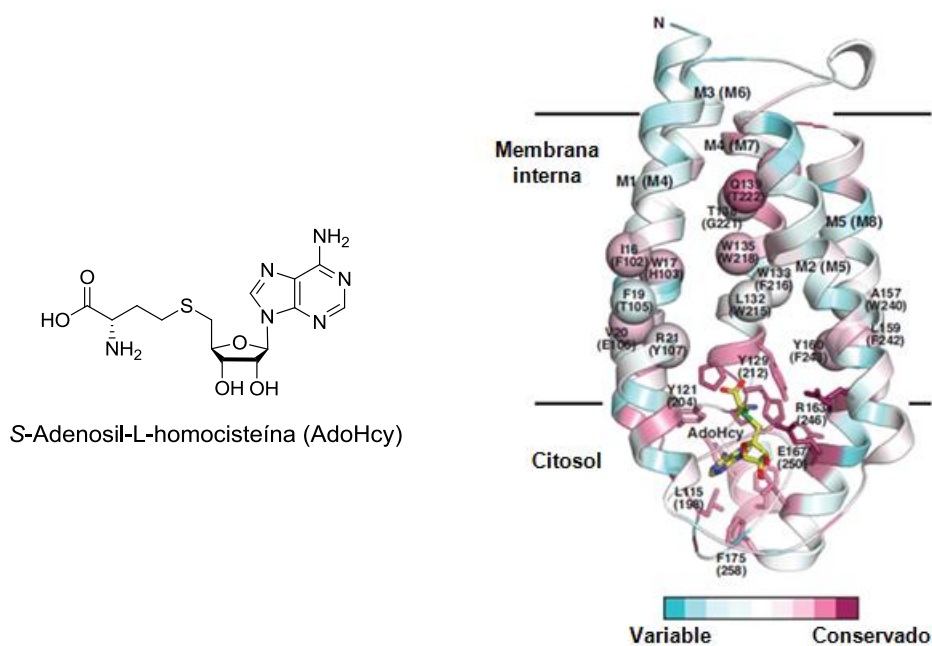


Figura 11. Representación gráfica de la estructura de *Ma*-ICMT (PDB: 4A2N) en complejo con S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy, en amarillo) coloreada de acuerdo a la conservación en su secuencia de aminoácidos con los miembros de la familia ICMT (rosa: alta conservación; azul: baja conservación). La numeración de los aminoácidos corresponde a *Ma*-ICMT, con la de *Ag*-ICMT entre paréntesis (siendo ésta equivalente a la numeración de *Hs*-ICMT menos uno).¹¹⁶

A continuación, este modelo computacional de la enzima *Hs*-ICMT se utilizó para elaborar un modelo de farmacóforo basado en la estructura. Así, se posicionó un grupo aceptor de enlace de hidrógeno (HBA, esfera verde y flecha) sobre el átomo de oxígeno presente en el grupo carboxilo de AFC o el grupo carbonilo amídico de *cysmethynil*; se situó un segundo grupo aceptor de enlace de hidrógeno (esfera verde y flecha) sobre el átomo de oxígeno del grupo amida de AFC; y se colocó una subunidad hidrofóbica (HYD, esfera azul) en las proximidades del átomo de carbono que une el grupo farnesilo al resto de la molécula en AFC o en el anillo de indol de *cysmethynil* (Figura 12A).

Empleando este modelo de farmacóforo, se llevó a cabo el cribado de una selección de compuestos de la quimioteca del Laboratorio de Química Médica de la UCM utilizando un método de ajuste flexible con el programa Discovery Studio 3.5.¹¹⁸ Entre los compuestos analizados, destacó el derivado **UCM1333** (Figura 12B). Sin embargo, al comparar las interacciones de *Hs*-ICMT con AFC y *cysmethynil* (Figura 12A) con las correspondientes entre la proteína y el compuesto **UCM1333** (Figura 12B), se pone de manifiesto la posibilidad de incorporar una cadena hidrofóbica que se expanda a través de la membrana mediante el túnel del sustrato, de forma similar al grupo farnesilo de AFC o a la cadena alifática de *cysmethynil*.

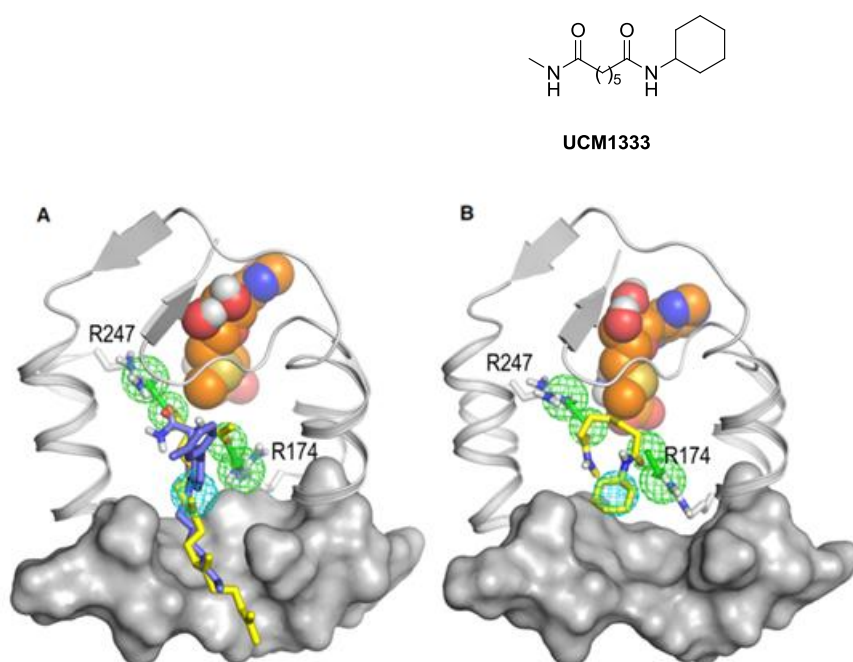


Figura 12. **A.** Superposición de los complejos formados por *Hs*-ICMT y AFC (en amarillo) y *cysmethynil* (en azul) obtenidos mediante simulaciones de DM. Estas simulaciones se usaron para desarrollar un modelo de farmacóforo formado por dos grupos aceptores de enlace de hidrógeno (esferas verdes y flechas) y una subunidad hidrofóbica (esfera azul). **B.** El compuesto **UCM1333** (en amarillo), procedente de la quimioteca del Laboratorio de Química Médica de la UCM, fue identificado mediante ajuste en el modelo de farmacóforo. En ambos casos, el cosustrato SAM se representa en forma de esferas.

Así, se diseñó el compuesto **UCM13140** (Figura 13), el cual incorpora en su estructura una cadena de *n*-octilo anclada sobre un átomo de nitrógeno. El modelo de *docking* de este nuevo derivado (Figura 13) indicó que la cadena lipofílica ocupa el túnel del sustrato de manera similar a como sucede para AFC y *cysmethynil*, sugiriendo una mayor capacidad de unión a la enzima que en el caso del derivado **UCM1333**.

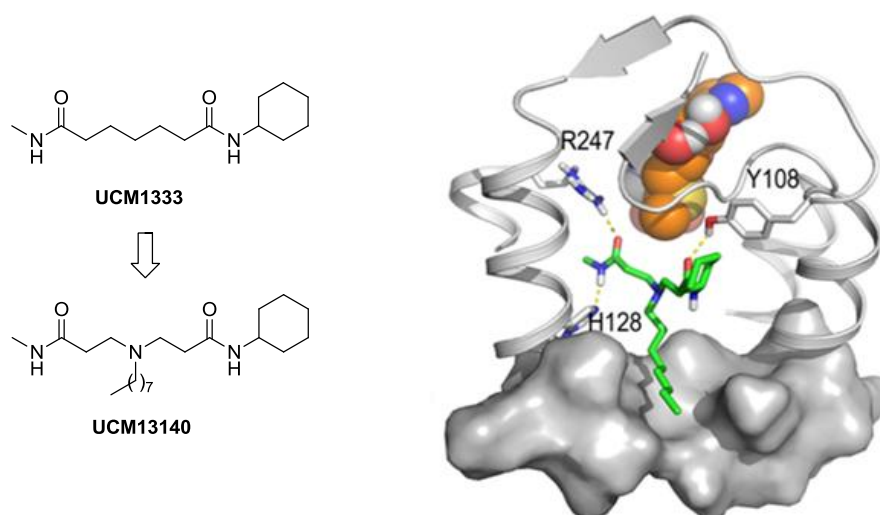
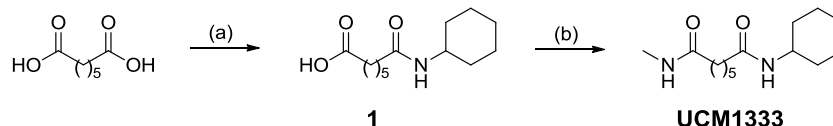


Figura 13. El compuesto **UCM13140** (en verde) presenta una cadena de *n*-octilo que puede expandirse a través de la membrana empleando el túnel del sustrato (representado como una superficie gris), de forma similar a como sucede con el residuo hidrofóbico de *cysmethynil* y AFC. El cosustrato SAM se muestra en forma de esferas.

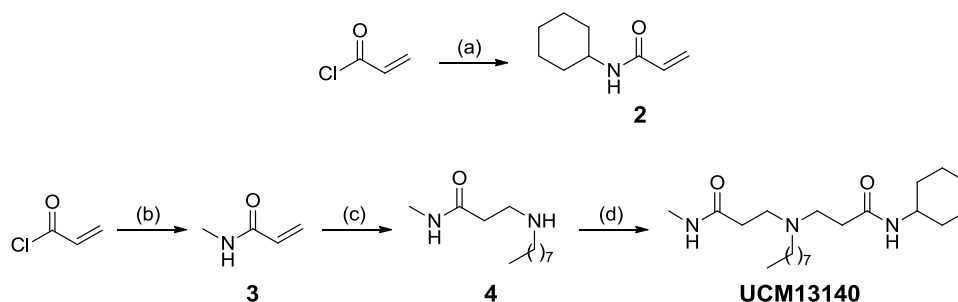
Con el fin de validar el modelo de farmacóforo basado en la estructura se sintetizaron los compuestos **UCM1333** y **UCM13140**, y se puso a punto el ensayo para determinar la actividad de la enzima ICMT en presencia de estos derivados. La síntesis del compuesto **UCM1333** (Esquema 1) se llevó a cabo siguiendo un procedimiento puesto a punto con anterioridad en nuestro laboratorio mediante reacciones sucesivas de acoplamiento de ácido pimélico con ciclohexilamina y metilamina, utilizando como agentes de acoplamiento anhídrido acético en el primer caso y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) en el segundo. Por otra parte, la síntesis de **UCM13140** se realizó mediante reacciones sucesivas de tipo

aza-Michael entre octilamina y las acrilamidas **2** y **3**, previamente preparadas por reacción entre cloruro de acrilóilo y las aminas correspondientes (Esquema 2).



Reactivos y condiciones: (a) i. Ac_2O , reflujo; ii. ciclohexilamina, THF, t.a., 100%; (b) metilamina 1 M en THF, EDC, HOBT, DCM, t.a., 21%.

Esquema 1



Reactivos y condiciones: (a) ciclohexilamina, piridina, DCM, 0 °C a t.a., 73%; (b) metilamina 1 M en THF, Et_3N , THF, -78 °C a 0 °C, 100%; (c) octilamina (3 equiv.), DBU, CH_3CN , 60 °C, 61%; (d) acrilamida **2**, DBU, CH_3CN , reflujo, 21%.

Esquema 2

Por otra parte, la puesta a punto del ensayo para determinar la actividad de la enzima ICMT implicó, en primer lugar, el clonaje y expresión de la proteína ICMT de forma recombinante, siguiendo el procedimiento indicado en la Figura 14.

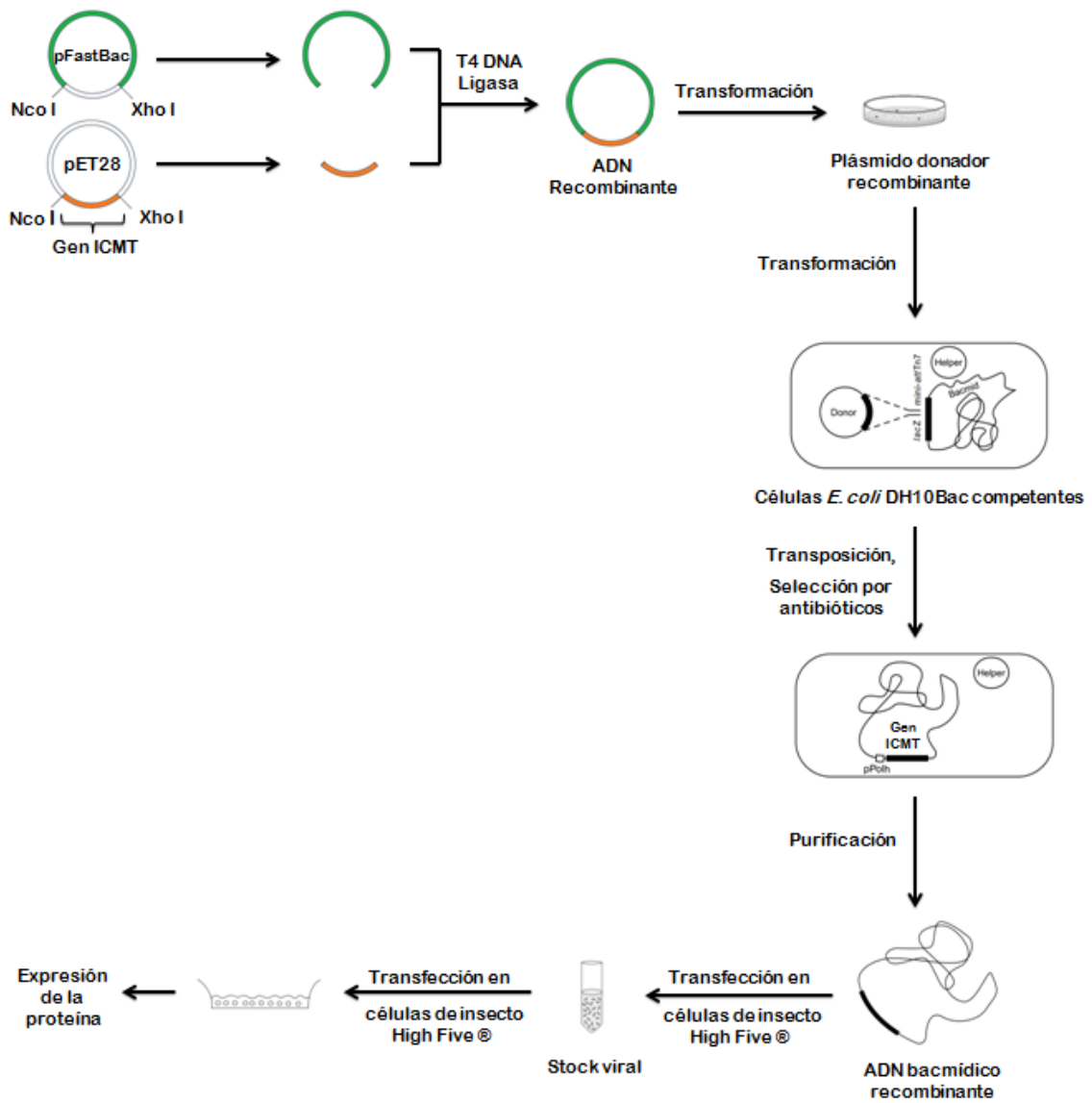


Figura 14. Clonaje y expresión de la proteína ICMT recombinante.

Una vez obtenida la enzima, se intentó inicialmente llevar a cabo el ensayo para determinar su actividad basado en fluorescencia descrito por Judd *et al.*⁷⁹ Sin embargo, la ausencia de resultados positivos en nuestro caso nos llevó a utilizar el ensayo alternativo descrito por Baron *et al.*¹¹⁹ basado en el empleo de *S*-adenosilmetionina tritiada ($[^3\text{H}]\text{SAM}$) como co-sustrato donador de grupos metilo. De este modo, la enzima ICMT cataliza la transferencia del grupo metilo marcado radiactivamente al sustrato biotinil-*S*-fanesilcisteína (BFC) y, tras enriquecimiento con estreptavidina unida a un soporte sólido, se puede cuantificar la radiactividad incorporada al sustrato de la reacción (Figura 15). Este ensayo requirió la síntesis previa del sustrato BFC (Esquema 3). Por otra parte, se sintetizó el compuesto *cysmethynil* para emplearlo como control del ensayo, siguiendo la ruta previamente descrita en la bibliografía⁷¹ (Esquema 4).

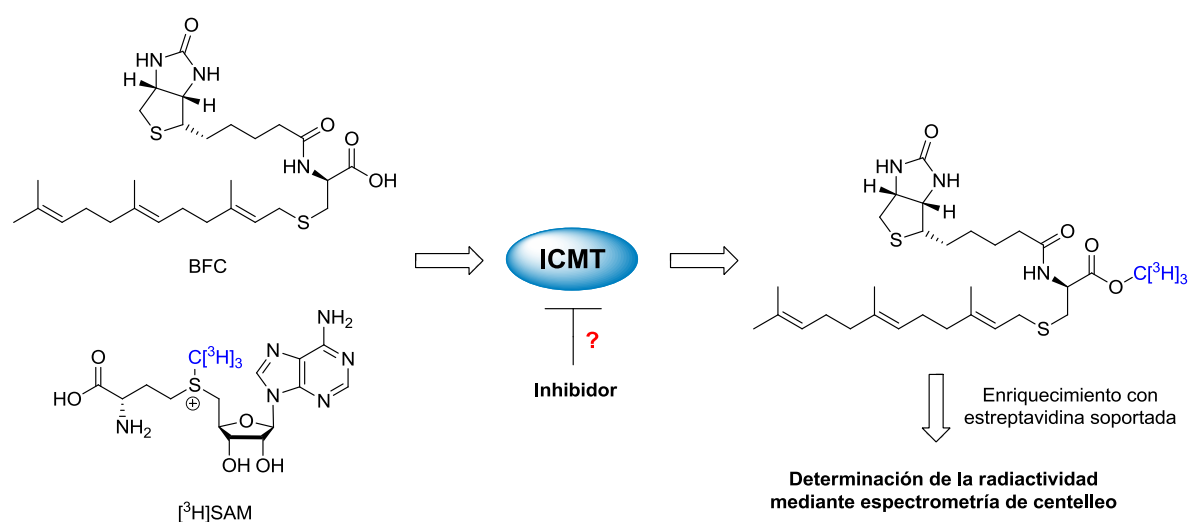
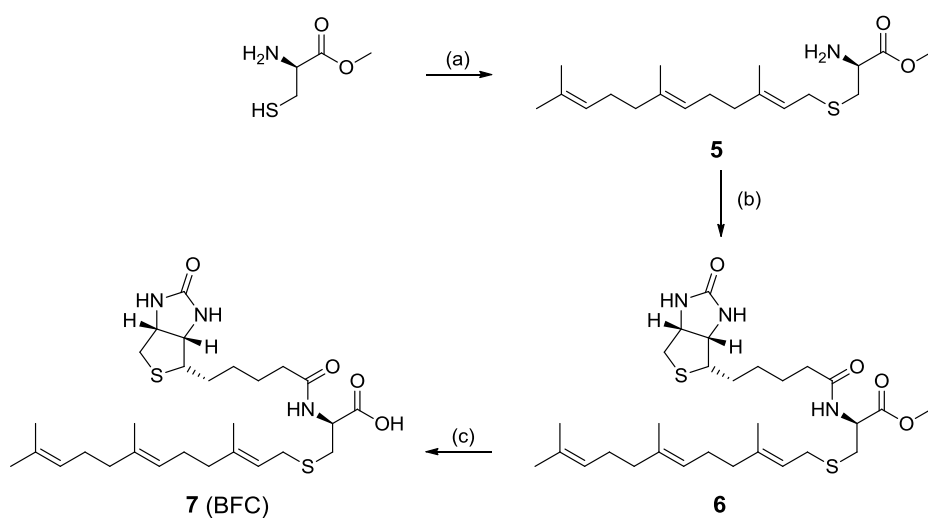
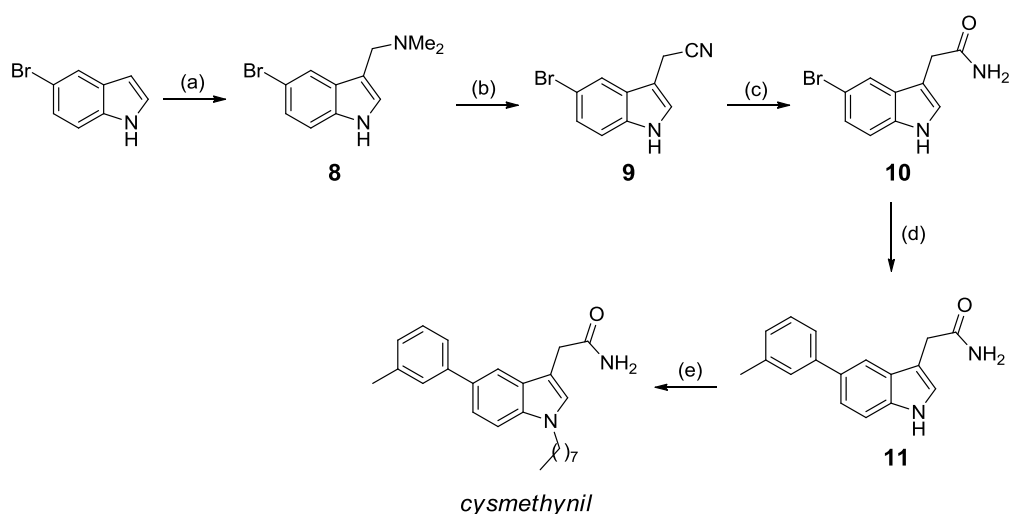


Figura 15. Esquema del ensayo de actividad de la enzima ICMT.



Reactivos y condiciones: (a) cloruro de farnesilo, NH_3 2 M en MeOH, 0 °C a t.a., 98%; (b) biotina, tamices moleculares, HOBt, DCC, DMAP, DMF, 60 °C a t.a., 72%; (c) NaOH 7 M en MeOH, 0 °C, 77%.

Esquema 3

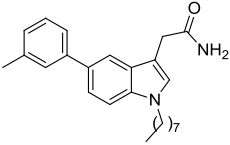
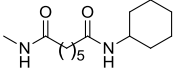
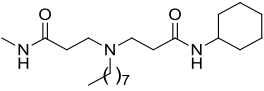


Reactivos y condiciones: (a) CH₂O 37% en H₂O, (CH₃)₂NH 40% en H₂O, 1,4-dioxano, AcOH, 0 °C a t.a., 83%; (b) KCN, (CH₃)₂SO₄, THF, 10 °C a 60 °C, 95%; (c) KOH, *t*-BuOH, reflujo, 74%; (d) ácido *m*-tolilborónico, Pd(PPh₃)₄, NaHCO₃, PhMe, EtOH, reflujo, 23%; (e) NaH, Br(CH₂)₇CH₃, DMF, 55 °C, 43%.

Esquema 4

A continuación, se determinó la capacidad de los compuestos **UCM1333**, **UCM13140** y *cysmethynil* para inhibir la actividad de la enzima ICMT (Tabla 1). Los resultados obtenidos muestran que, tal y como sugería el modelo de farmacóforo, el compuesto **UCM1333** es capaz de bloquear con una potencia moderada (30% de inhibición a una concentración 50 μM) la actividad de ICMT; mientras que en el caso de **UCM13140** se produce un aumento de la inhibición hasta un 55% a 50 μM, por lo que este derivado fue seleccionado como *hit*. Por otra parte, *cysmethynil* mostró una inhibición del 90% de la actividad ICMT a 50 μM, resultado que está de acuerdo con lo descrito en la bibliografía.⁷¹ Sin embargo, *cysmethynil* presenta ciertos inconvenientes como candidato a fármaco debido a su elevada lipofilia, su baja solubilidad en agua y su afinidad por las proteínas del plasma.⁷⁴

Tabla 1. Evaluación de la capacidad de los compuestos **UCM1333**, **UCM13140** y *cysmethynil* para inhibir la actividad ICMT.

Compuesto	Estructura	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
<i>Cysmethynil</i>		90
UCM1333		30
UCM13140		55

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μ M.

3.2. Programa de química médica

Una vez identificado el *hit* **UCM13140** y con el objetivo de obtener inhibidores más potentes y con buenas propiedades farmacocinéticas llevamos a cabo un programa de química médica a partir de este *hit*. Así, en primer lugar diseñamos los compuestos **12** y **13** (Figura 16), en los que el grupo metilo se sustituyó por un grupo hidrofóbico (ciclohexilo) o aromático (fenilo). La síntesis del derivado **12** se llevó a cabo mediante alquilación de octilamina con la acrilamida **2**. Por otra parte, para la obtención del compuesto **13** fue necesario preparar previamente la anilida **14**, cuyo acoplamiento con octilamina y posterior reacción con la acrilamida **2** permitió obtener la diamida de interés **13** (Esquema 5).

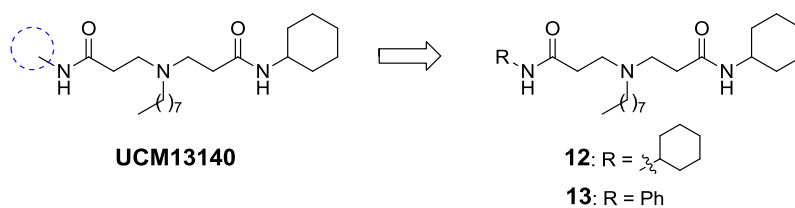
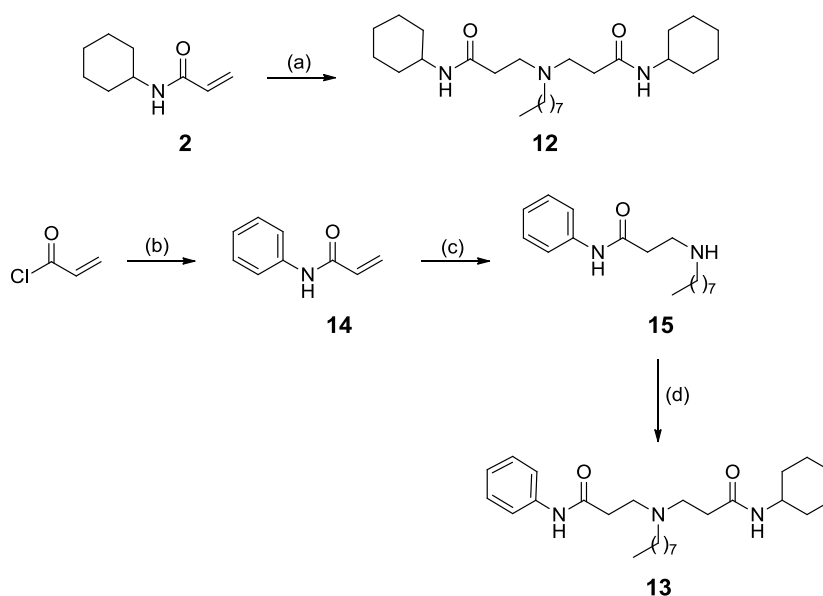


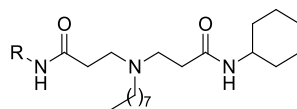
Figura 16. Diseño de los compuestos **12** y **13**.



Reactivos y condiciones: (a) octilamina (1 equiv.), DBU, CH₃CN, reflujo, 27%; (b) anilina, piridina, DCM, 0 °C a t.a., 100%; (c) octilamina (3 equiv.), DBU, CH₃CN, 60 °C, 76%; (d) acrilamida **2**, DBU, CH₃CN, reflujo, 34%.

Esquema 5

La determinación de la capacidad de los compuestos sintetizados para inhibir la actividad de la enzima ICMT (Tabla 2) permitió identificar el compuesto **13** como el de mayor potencia inhibitoria con un excelente 82% de inhibición de la actividad ICMT a 50 μM.

Tabla 2. Capacidad de los compuestos **UCM13140**, **12** y **13** para inhibir la enzima ICMT.

Compuesto	R	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
UCM13140	CH ₃	55
12		55
13	Ph	82

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μ M.

A partir del compuesto **13** se plantearon los compuestos **16-23** (Figura 17), en los que se conserva la cadena de octilo y el grupo fenilo, y se reemplaza el anillo de ciclohexilo por diferentes sustituyentes tanto alifáticos como aromáticos. La síntesis de los compuestos **16-20**, **22** y **23** (Esquema 6) se llevó a cabo de la forma habitual, mediante una reacción aza-Michael entre el intermedio **15** y las anilidas correspondientes. La obtención de las anilidas **24-28** se llevó a cabo por acoplamiento de las aminas adecuadas con cloruro de acilo, siendo la *N*-etilacrilamida y la *N*-isopropilacrilamida comerciales. Por otra parte, la diamida simétrica **21** se sintetizó mediante reacción de octilamina con la acrilamida **14**, usando DBU como base (Esquema 6).

La evaluación biológica de los compuestos sintetizados indicó que la mayoría de los cambios introducidos no se traducen en un aumento de la potencia inhibitoria (Tabla 3), con la única excepción del compuesto **21**, el cual muestra un excelente 93% de inhibición a una concentración 50 μ M (CI_{50} = 2 μ M) y un valor aceptable de lipofilia (cLogP = 4.1). A partir de este compuesto se continuó con la exploración estructural mediante la modificación de la cadena lipofílica, así como la introducción de sustituyentes en el anillo de fenilo (Figura 18).

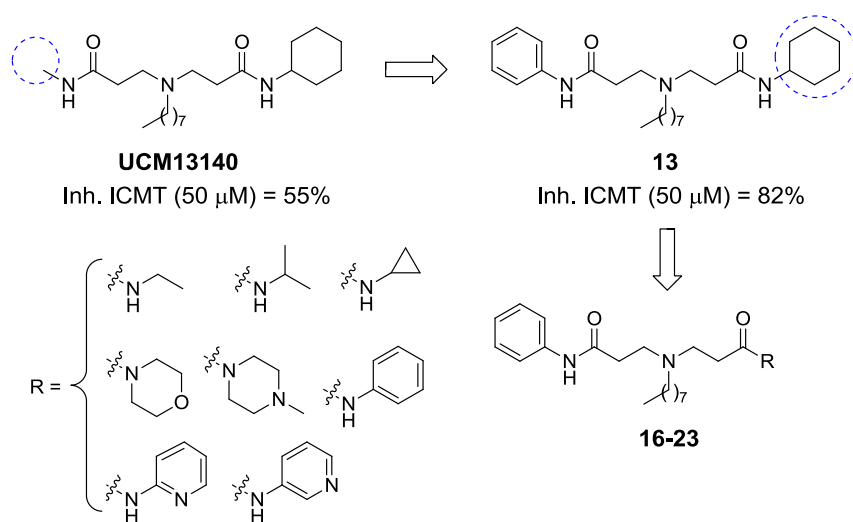
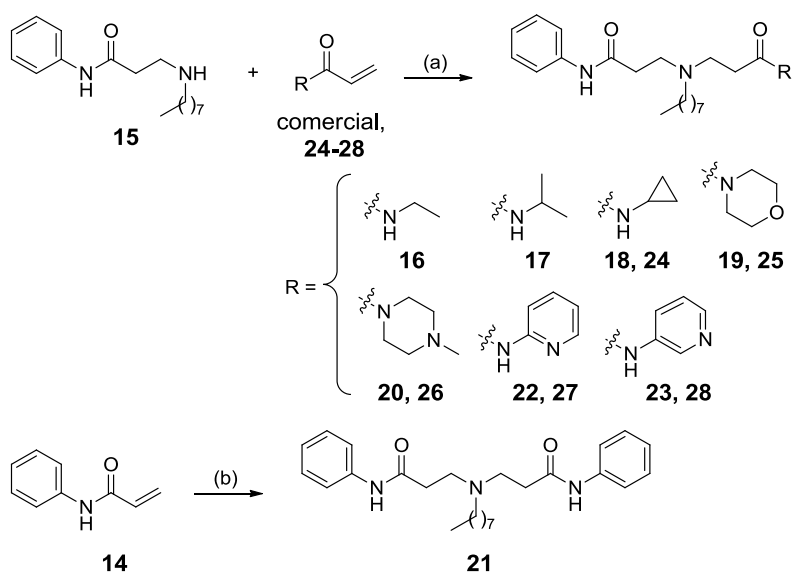
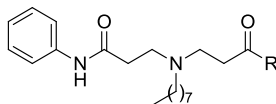


Figura 17. Diseño de los derivados **16-23**.



Reactivos y condiciones: (a) DBU, CH_3CN , reflujo, 22-60%; (b) octilamina, DBU, CH_3CN , reflujo, 83%.

Esquema 6

Tabla 3. Evaluación de la capacidad de los compuestos **13** y **16-23** para inhibir a la enzima ICMT.

Compuesto	R	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
13		82
16		26
17		20
18		48
19		0
20		29
21		93
22		24
23		18

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μ M.

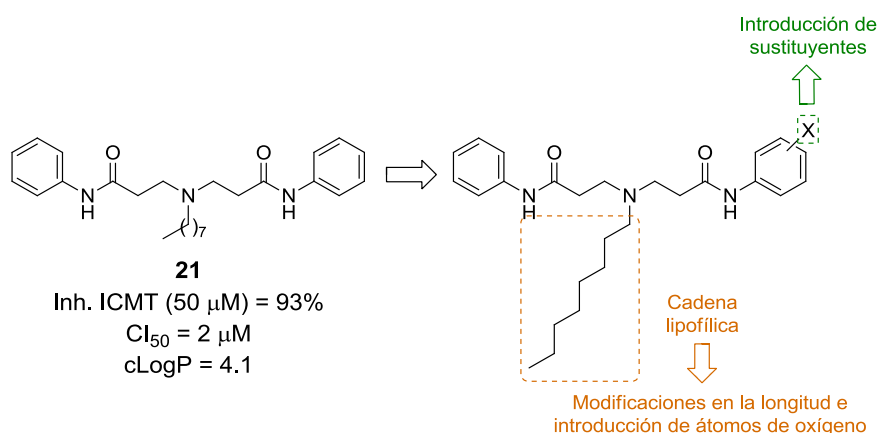
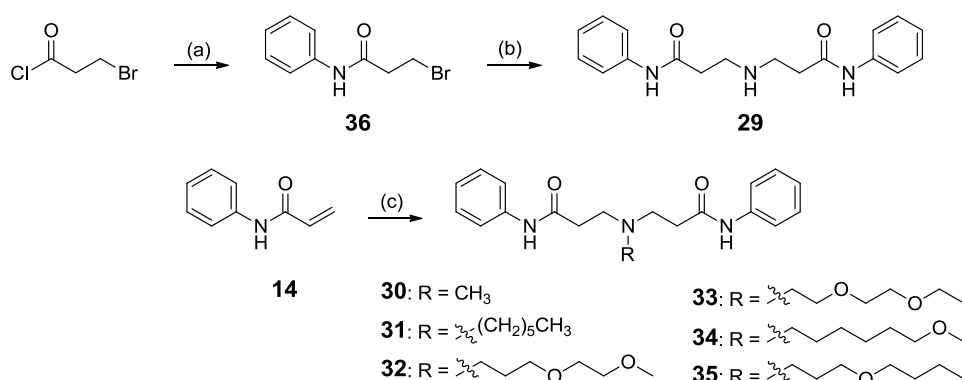


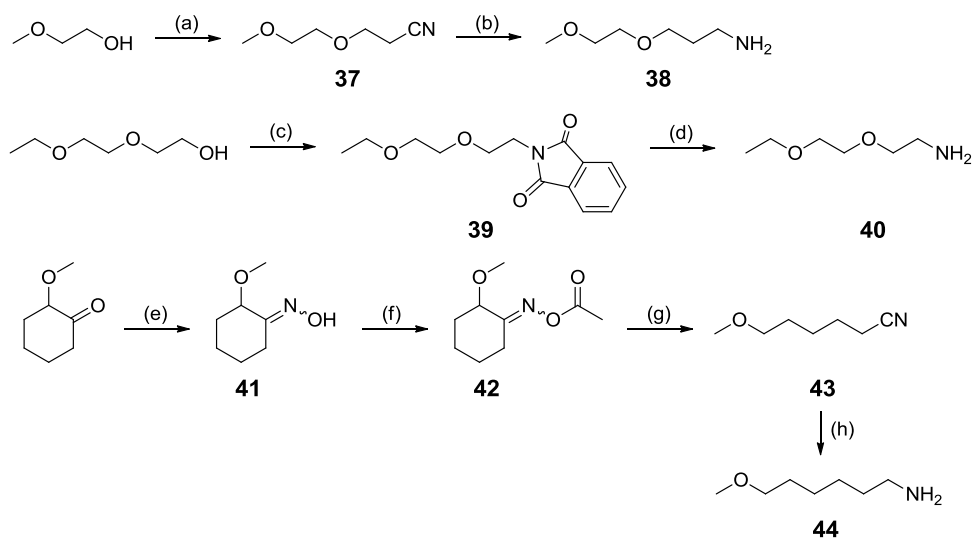
Figura 18. Modificaciones del compuesto **21**.

Con respecto a la cadena lipofílica se estudió su longitud óptima y la posibilidad de introducir átomos de oxígeno en dicha cadena, modificaciones que en ambos casos conducirían a una disminución de la lipofilia (cLogP = 0.39-3.05). Así, se plantearon los compuestos **29-35**, cuya síntesis (Esquema 7) se llevó a cabo por adición aza-Michael de la amina correspondiente sobre *N*-fenilacrilamida (**14**) en presencia de DBU. Sin embargo, la adición de amoníaco sobre la acrilamida **14** condujo a una mezcla compleja en la que no se observó la formación de **29**, por lo que este derivado se preparó mediante tratamiento de 3-bromo-*N*-fenilpropanamida (**36**) con amoníaco. Por otra parte, las aminas no comerciales **38**, **40** y **44** se obtuvieron siguiendo las rutas indicadas en el Esquema 8. Así, la amina **38** se sintetizó mediante adición de acrilonitrilo a 2-metoxietanol y posterior reducción del nitrilo formado **37**. A su vez, la amina **40** se preparó mediante reacción de Mitsunobu de 2-(2-etoxietoxi)etanol y ftalimida, seguido de la desprotección de la ftalimida **39** con hidracina y borohidruro sódico. Para la síntesis del derivado **44** se partió de 2-metoxiciclohexanona, que por formación de la oxima correspondiente **41** y posterior acetilación con anhídrido acético, permitió acceder al intermedio **42**. La apertura de este derivado mediante reacción de transposición de Beckmann dio lugar al nitrilo **43**, cuya posterior reducción condujo a la obtención de la amina deseada **44**.



Reactivos y condiciones: (a) anilina, piridina, DCM, 0 °C a t.a., 92%; (b) NH₃, DCM, t.a., 15%; (c) RNH₂, DBU, CH₃CN, reflujo, 21-95%;

Esquema 7

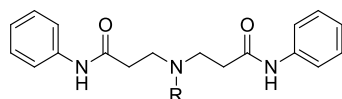


Reactivos y condiciones: (a) acrilonitrilo, KOH, 0 °C, 100%; (b) BH₃, THF, reflujo, 89%; (c) DIAD, PPh₃, ftalimida, MeOH, PhMe, 0 °C a t.a., 58%; (d) N₂H₄·H₂O, NaBH₄, MeOH, t.a., 71%; (e) H₂N-OH·HCl, AcONa, MeOH, 60 °C, 99%; (f) (Ac)₂O, piridina, t.a., 85%; (g) Et₃SiH, TMSOTf, DCM, 0 °C, 87%; (h) BH₃, THF, reflujo, 67%.

Esquema 8

La determinación de la capacidad de las diamidas **29-35** para inhibir la actividad ICMT (Tabla 4) puso de manifiesto que la cadena de *n*-octilo constituye un elemento imprescindible para la actividad en esta serie de compuestos, ya que ninguna de las modificaciones introducidas conduce a una inhibición superior al 45% a una concentración de 50 μM , valor muy alejado del excelente 93% de inhibición mostrado por el compuesto **21**. Este hecho podría ser debido a que las moléculas no cuentan con un residuo lo suficientemente hidrofóbico para insertarse en el túnel del sustrato, tal y como sí ocurre en el derivado **21**.

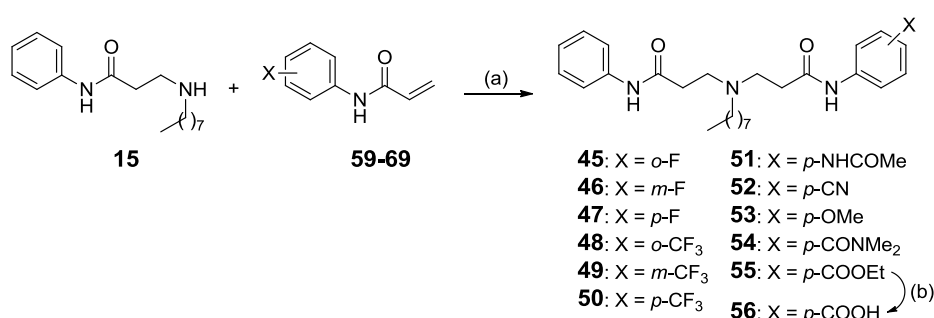
Tabla 4. Influencia de la cadena lipofílica en la inhibición de la enzima ICMT.



Comp.	R	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
21	(CH ₂) ₇ CH ₃	93
29	H	9
30	CH ₃	10
31	(CH ₂) ₅ CH ₃	30
32		45
33		15
34		30
35		14

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μM .

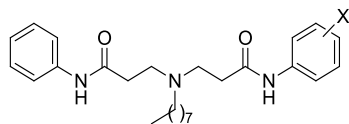
Por otra parte, con el objetivo de seguir explorando el campo estructural del derivado **21**, se diseñaron los compuestos **45-56** (Esquema 9), los cuales incorporan en su estructura distintos sustituyentes en uno de los anillos benzénicos. La síntesis de estos derivados (Esquema 9) se llevó a cabo por acoplamiento entre *N*¹-fenil-*N*³-octil-β-alaninamida (**15**) y las acrilamidas correspondientes **59-69**, las cuales se sintetizaron siguiendo el procedimiento habitual. Para la obtención de 4-(acrililamino)-*N,N*-dimetilbenzamida (**68**) fue necesaria la preparación previa de la anilina correspondiente **58** a partir de ácido 4-(Boc-amino)benzoico y clorhidrato de dimetilamina, seguido de desprotección del grupo Boc del intermedio **57**.



Reactivos y condiciones: (a) DBU, CH₃CN, reflujo, 32-100%; (b) LiOH·H₂O, THF/H₂O, reflujo, 28%.

Esquema 9

La determinación de la capacidad de los compuestos **45-56** para inhibir la actividad ICMT (Tabla 5) y el posterior análisis de los resultados obtenidos muestra que, por una parte, los derivados sustituidos en posición *para* del anillo resultan más potentes que sus análogos sustituidos en *orto* y *meta*. Por otra parte, en cuanto a la influencia de los efectos electrónicos, no se observa ninguna correlación clara entre la actividad de los compuestos y el carácter electrodonador o electroaceptor de los sustituyentes del anillo. En cualquier caso, ninguno de los cambios introducidos en los compuestos mejoran el excelente valor de inhibición del derivado **21** (93% de inhibición a 50 μM).

Tabla 5. Capacidad de los compuestos **21** y **45-56** para inhibir la enzima ICMT.

Comp.	X	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}	Comp.	X	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
21	H	93	51	<i>p</i> -NHCOMe	40
45	<i>o</i> -F	23	52	<i>p</i> -CN	68
46	<i>m</i> -F	23	53	<i>p</i> -OMe	53
47	<i>p</i> -F	84	54	<i>p</i> -CONMe ₂	47
48	<i>o</i> -CF ₃	30	55	<i>p</i> -COOEt	21
49	<i>m</i> -CF ₃	35	56	<i>p</i> -COOH	15
50	<i>p</i> -CF ₃	63			

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μ M.

Continuando con los estudios de relación estructura-actividad consideramos llevar a cabo modificaciones en el grupo amida del derivado **21** (Figura 19). Así, se sustituyó dicho grupo por una sulfonamida (compuestos **70** y **71**) y se introdujeron grupos metilo en el NH amídico (derivados **72** y **73**). Por otra parte, se estudió la influencia del acortamiento del espaciador (compuestos **74-76**). La síntesis de los derivados **70-73** se llevó a cabo siguiendo la metodología habitual de adición de la amina necesaria a la acrilamida o sulfonamida correspondiente (Esquemas 10 y 11). Por su parte, los compuestos **74-76** (Esquema 12) se obtuvieron por reacción de sustitución nucleófila de

la halocetona correspondiente con la amina secundaria **15** (derivados **74** y **75**) o por acilación de **15** con ácido benzoico (diamida **76**).

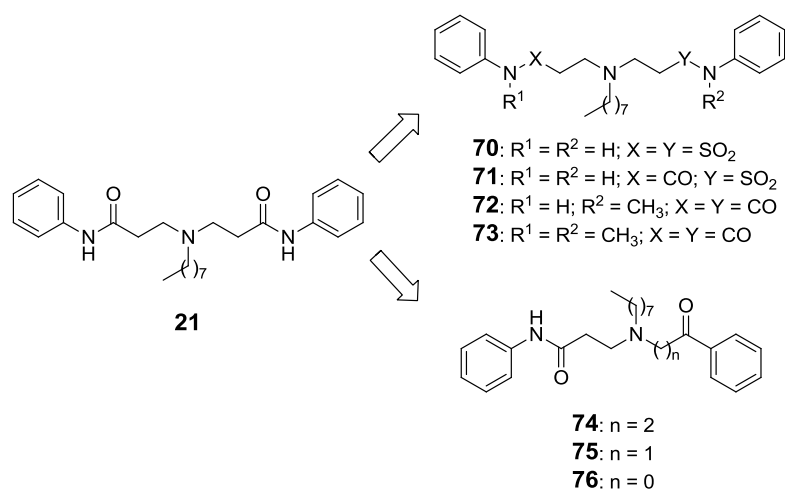
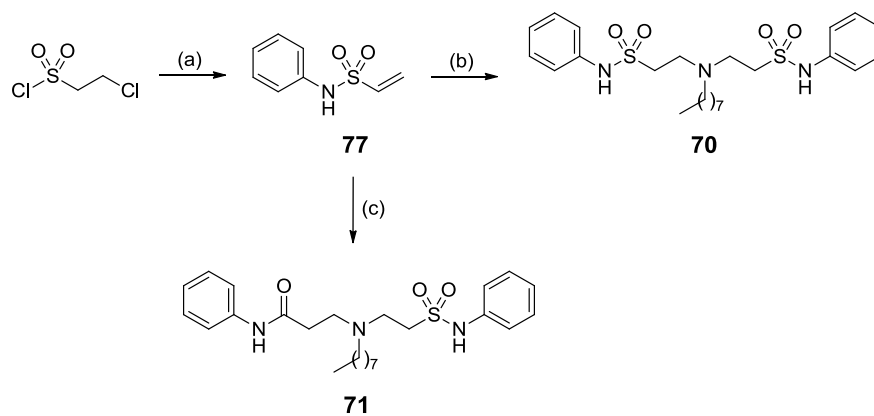
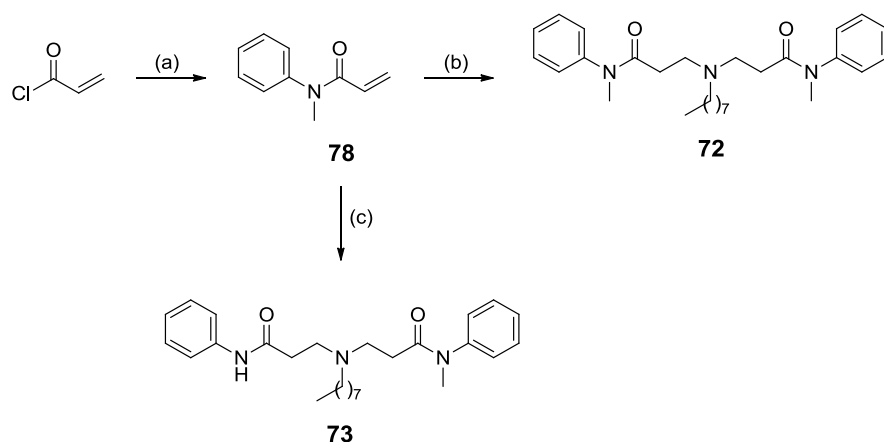


Figura 19. Diseño de los compuestos **70-76**.



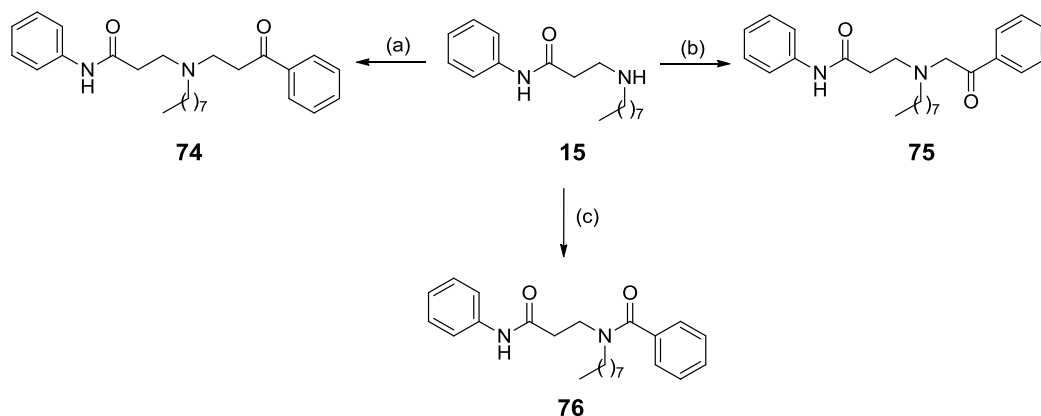
Reactivos y condiciones: (a) anilina, piridina, DCM, 0 °C a t.a., 30%; (b) octilamina, DBU, CH₃CN, reflujo, 44%; (c) *N*¹-fenil-*N*³-octil-β-alaninamida (**15**), DBU, CH₃CN, reflujo, 12%.

Esquema 10



Reactivos y condiciones: (a) *N*-metilanilina, piridina, DCM, 0 °C a t.a., 100%; (b) octilamina, DBU, CH₃CN, reflujo, 64%; (c) *N*¹-fenil-*N*³-octil-β-alaninamida (**15**), DBU, CH₃CN, reflujo, 58%.

Esquema 11



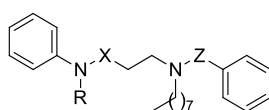
Reactivos y condiciones: (a) 3-cloropropiopenona, NaHCO₃ 1 M en H₂O, CH₃CN, t.a., 43%; (b) 2-bromoacetofenona, K₂CO₃, CH₃CN, t.a., 56%; (c) ácido benzoico, EDC, HOBT, DCM, t.a., 72%.

Esquema 12

La evaluación biológica de los derivados **70-73** y **76** permitió determinar su capacidad para bloquear la actividad de la enzima ICMT (Tabla 6). Los compuestos **74** y **75**, sin embargo, no mostraron una estabilidad suficiente como para determinar su potencia inhibitoria. El análisis de los datos obtenidos muestra, por una parte, que la sustitución de uno o los dos grupos amida por grupos sulfonamida supone una pérdida dramática de la

actividad de los compuestos, con valores de inhibición del 34% y el 22% a una concentración de 50 μM para los derivados **70** y **71**, respectivamente. Por otra parte, la metilación de uno o los dos grupos NH conlleva un moderado descenso de la potencia inhibitoria de los compuestos, como se observa en los derivados **72** y **73**, los cuales muestran una inhibición del 68% a 50 μM . De entre todas las modificaciones introducidas en el espaciador destaca la diamida **76**, la cual es capaz de bloquear el 80% de la actividad ICMT a una concentración 50 μM .

Tabla 6. Capacidad de los compuestos **21** y **70-76** para inhibir la enzima ICMT.



Comp.	R	X	Z	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
21	H	CO	-(CH ₂) ₂ CONH-	93
70	H	SO ₂	-(CH ₂) ₂ SO ₂ NH-	34
71	H	CO	-(CH ₂) ₂ SO ₂ NH-	22
72	H	CO	-(CH ₂) ₂ CON(CH ₃)-	68
73	CH ₃	CO	-(CH ₂) ₂ CON(CH ₃)-	68
74	H	CO	-(CH ₂) ₂ CO-	ND ^c
75	H	CO	-CH ₂ CO-	ND ^c
76	H	CO	-CO-	80

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μM . ^c ND: no determinado.

A continuación, con el fin de explorar en mayor profundidad la relación estructura-actividad en el derivado **76**, se diseñaron los compuestos **79-92** (Figura 20). Los compuestos **79-85** incorporan diferentes sustituyentes en el anillo bencénico, mientras que en los derivados **86-92** se ha llevado a cabo la sustitución del grupo fenilo por distintos anillos heteroaromáticos. Todos estos compuestos se sintetizaron (Esquema 13) por reacción de *N*¹-fenil-*N*³-octil-β-alaninamida (**15**) con los ácidos comerciales correspondientes, utilizando EDC y HOBt como agentes de acoplamiento.

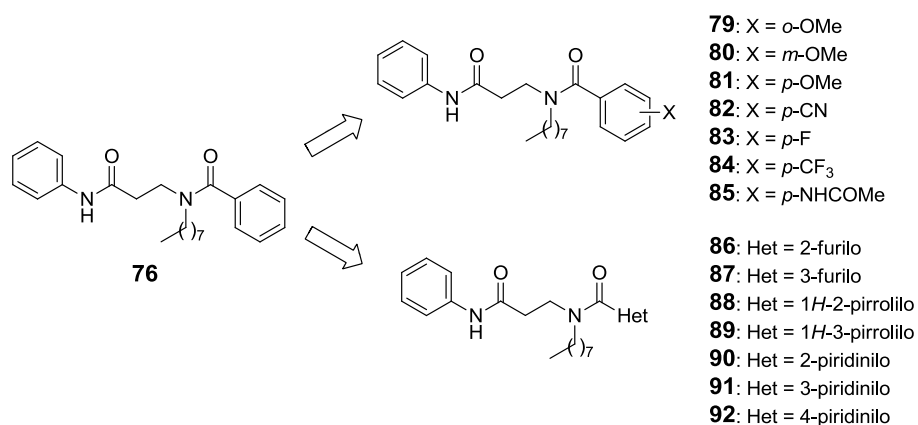
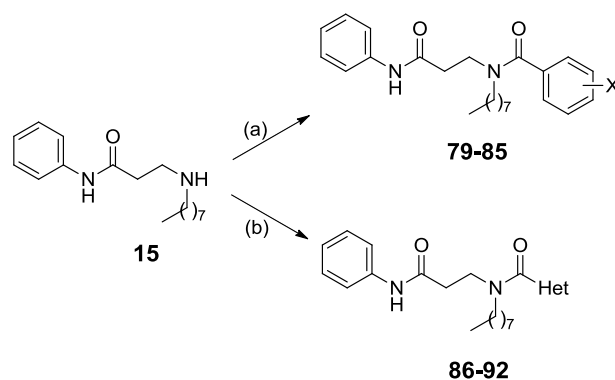


Figura 20. Diseño de los compuestos **79-92**.

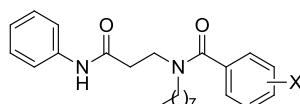


Reactivos y condiciones: (a) Ar-COOH, EDC, HOBt, DCM, t.a., 66-73%; (b) Het-COOH, EDC, HOBt, DCM, t.a., 36-100%.

Esquema 13

Se determinó la capacidad de los compuestos **79-85** para bloquear la actividad ICMT (Tabla 7) y ninguno de los cambios estructurales introducidos consigue mejorar el valor de inhibición del derivado **76** de partida (80% de inhibición a 50 μ M).

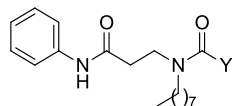
Tabla 7. Capacidad de los compuestos **76** y **79-85** para inhibir la enzima ICMT.



Comp.	X	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}	Comp.	X	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
76	H	80	82	<i>p</i> -CN	66
79	<i>o</i> -OMe	32	83	<i>p</i> -F	42
80	<i>m</i> -OMe	26	84	<i>p</i> -CF ₃	18
81	<i>p</i> -OMe	60	85	<i>p</i> -NHCOMe	10

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μ M.

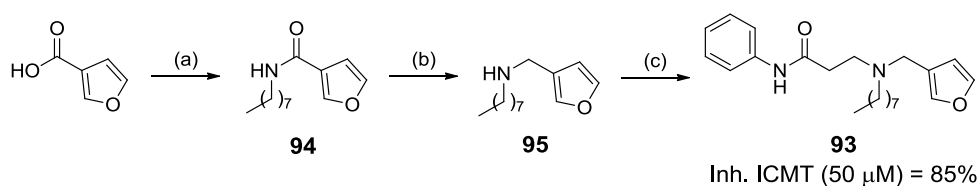
Con respecto a los compuestos **86-92**, de su capacidad para inhibir la actividad ICMT (Tabla 8) se observa que la sustitución de un grupo fenilo (compuesto **76**, 80% de inhibición a 50 μ M) por un anillo 3-furilo (compuesto **90**, 81% de inhibición a 50 μ M) o pirrol (derivados **88** y **89**, 75% y 81% de inhibición a 50 μ M, respectivamente) mantiene la potencia inhibitoria en estos compuestos.

Tabla 8. Capacidad de los compuestos **76** y **86-92** para inhibir la enzima ICMT.

Compuesto	Y	Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
76	Ph	80
86		49
87		81
88		75
89		81
90		63
91		38
92		30

^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μM .

A la vista de estos resultados, decidimos estudiar la influencia del grupo carbonilo contiguo al anillo heterocíclico. Para ello, teniendo en cuenta la asequibilidad sintética, se diseñó el compuesto **93**. Su síntesis se llevó a cabo mediante acoplamiento entre el ácido 3-furoico y octilamina, posterior reducción de la amida **94** con LiAlH_4 y reacción de aza-Michael con *N*-fenilacrilamida (**14**) en presencia de DBU (Esquema 14). La determinación de la potencia inhibitoria de este derivado puso de manifiesto su excelente capacidad para bloquear la actividad ICMT (85% de inhibición a 50 μM).



Reactivos y condiciones: (a) octilamina, EDC, HOBt, DCM, t.a., 100%; (b) LiAlH_4 , THF, reflujo, 57%; (c) *N*-fenilacrilamida (**14**), DBU, CH_3CN , reflujo, 20%.

Esquema 14

3.3. Evaluación de la capacidad citotóxica de los compuestos con mayor potencia inhibitoria de la actividad ICMT

Con el fin de determinar si alguno de los inhibidores de ICMT identificados hasta el momento podía ser un candidato para su desarrollo como compuesto antitumoral o para el tratamiento de la progeria, se seleccionaron aquellos derivados con un porcentaje de inhibición de la actividad ICMT superior al 80% a una concentración 50 μM (Figura 21) y se determinó su citotoxicidad en líneas tumorales de mama (MDA-MB-231 y MCF7) y próstata (PC-3) (Tabla 9). La evaluación de la citotoxicidad celular se llevó a cabo mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Tras la incubación en presencia del compuesto objeto de estudio durante 48 horas, las células que aún permanecen funcionales reducen el MTT generando un precipitado coloreado (formazán), el cual se cuantifica midiendo su absorbancia a 570 nm. La capacidad citotóxica de los compuestos se expresa a través del valor de su concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). En el caso de su posible aplicación en cáncer, sería deseable que el compuesto, además de ser efectivo en la inhibición de la actividad ICMT, presente actividad citotóxica. Por el contrario, un compuesto con interés para el tratamiento de la progeria, debería ser activo en la inhibición de ICMT sin ser citotóxico. Teniendo en cuenta estas consideraciones, entre los resultados obtenidos (Tabla 9) destacan los valores de inhibición y citotoxicidad mostrados por los derivados **21** (**UCM1336**) y **93** (**UCM13239**). Por una parte, el compuesto **UCM1336** resulta ser el más eficaz en la inhibición de la actividad ICMT y, al mismo tiempo, presenta una capacidad citotóxica significativa en las tres líneas celulares ensayadas. Por ello, este compuesto representa un excelente candidato para su posible aplicación en cáncer. Por otra parte, el derivado **93** presenta una potencia inhibitoria igualmente destacable, pero en este caso

no muestra actividad citotóxica en las líneas celulares ensayadas. Por tanto, se consideró **UCM13239** como un buen candidato para su posible aplicación en un modelo de progeria.

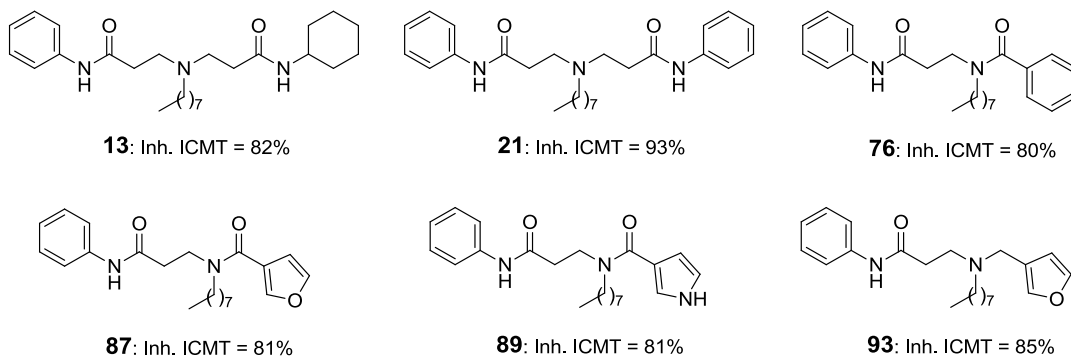


Figura 21. Selección de inhibidores de la enzima ICMT.

Tabla 9. Capacidad citotóxica de los derivados seleccionados.

Compuesto	Citotoxicidad, CI_{50} (μM) ^a			Inhibición de ICMT (%) ^{a,b}
	MDA-MB-231	MCF7	PC3	
<i>Cysmethynil</i>	24	24	23	90
13	29	16	29	82
21 (UCM1336)	17	11	23	93
76	35	24	31	80
87	35	31	35	81
89	39	27	36	81
93 (UCM13239)	>50	>50	>50	85

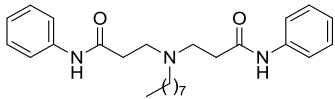
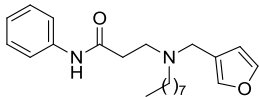
^a Los valores corresponden al valor medio de dos experimentos independientes realizados por triplicado con un error asociado menor del 10% en todos los casos. ^b Los valores de inhibición de ICMT se determinaron a una concentración de los compuestos ensayados de 50 μM .

3.4. Perfil farmacocinético *in vitro* de los compuestos seleccionados UCM1336 y UCM13239

Con el objetivo de determinar si los compuestos seleccionados presentan, además, un buen perfil farmacocinético, se estudió su estabilidad *in vitro* tanto en suero como frente al metabolismo hepático empleando microsomas como modelo de éste. En ambos casos los ensayos se realizaron con muestras humanas y de ratón. Así, para determinar la estabilidad en suero, tras incubar el compuesto a estudiar en el suero seleccionado a diferentes tiempos, las proteínas se separaron por centrifugación y se analizó el sobrenadante obtenido mediante cromatografía de líquidos de alta presión acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) obteniéndose así el tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Análogamente, la determinación del $t_{1/2}$ en microsomas se realizó mediante incubación a diferentes tiempos del compuesto a estudiar en presencia de la fracción microsomal

seleccionada y del cosustrato NADPH. El posterior tratamiento de las muestras, de forma análoga al caso anterior, y su análisis mediante HPLC-MS permitió obtener el $t_{1/2}$. Los resultados obtenidos (Tabla 10) muestran que ambos compuestos presentan unos valores aceptables de estabilidad, con $t_{1/2}$ >90 minutos en suero humano y entre 8 y 10 minutos en microsomas, lo que permite su empleo en modelos celulares.

Tabla 10. Estabilidad en suero y en microsomas de **UCM1336** y **UCM13239**.

Comp.	Estructura	Estabilidad en suero ($t_{1/2}$, min) ^a		Estabilidad en microsomas ($t_{1/2}$, min) ^a	
		Humano	Ratón	Humano	Ratón
UCM1336		>90	45 ± 8	10 ± 1	8 ± 1
UCM13239		> 90	32 ± 4	8.4 ± 0.5	11 ± 2

^a Los valores corresponden a la media ± DE de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

3.5. Estudio del compuesto **UCM1336** como agente antitumoral

Como se indicó en la introducción, el mecanismo de acción antitumoral de un inhibidor de la enzima ICMT se basa en que produce una inactivación de la proteína Ras impidiendo su localización en la membrana plasmática y, por tanto, disminuyendo los niveles de la forma activa de Ras (Ras-GTP), responsable de la estimulación de las vías de proliferación celular. Así, resulta fundamental estudiar si, efectivamente, el compuesto **UCM1336** impide la correcta localización de Ras en la membrana celular, así como la activación de esta proteína.

Con este objetivo, se incubaron células tumorales PC-3 con concentraciones crecientes del compuesto **UCM1336** o de *cysmethynil* durante 96 horas. Se seleccionó esta ventana de tiempo para los ensayos ya que permitía tanto la distribución celular de las nuevas proteínas Ras sintetizadas como la renovación de las proteínas Ras presentes al inicio del experimento. En condiciones control sin inhibidores de la enzima ICMT, Ras se localiza en la membrana plasmática (Figura 22). Por el contrario, se observa como el tratamiento con el compuesto **UCM1336** o *cysmethynil* produce la deslocalización de Ras hacia el citoplasma (Figura 22, 1-10 μM). Además, resulta destacable el hecho de que el efecto inducido por el derivado **UCM1336** es mayor que el producido por *cysmethynil* a la misma concentración, y se incrementa de forma dosis-dependiente.

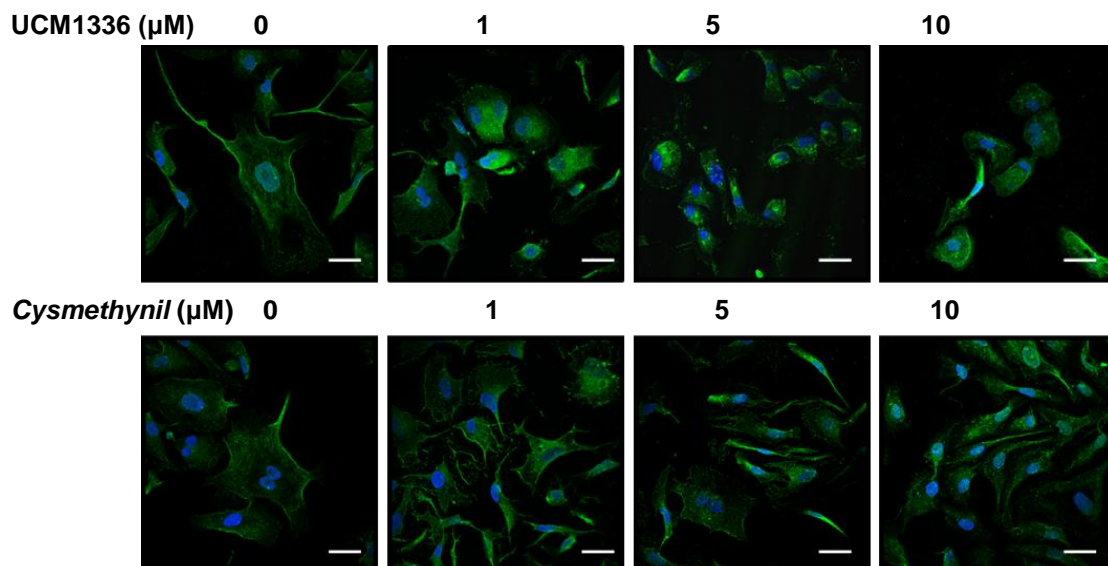


Figura 22. El compuesto **UCM1336** induce la deslocalización de Ras desde la membrana plasmática hacia el citoplasma de forma dosis-dependiente en células PC-3. En las imágenes de inmunofluorescencia, la proteína Ras aparece marcada en verde tras el empleo de un anticuerpo primario anti-Ras seguido del anticuerpo secundario adecuado conjugado con isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*, FITC). Los núcleos (en azul), se marcaron con Hoechst 33258. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal bajo las mismas condiciones y se corresponden con la vista representativa de un conjunto de 3 a 5 experimentos independientes. Barras, 30 μm .

A continuación, dado que la actividad de Ras depende de su asociación a la membrana plasmática, estudiamos la capacidad del compuesto **UCM1336** para bloquear la activación de Ras, determinando los niveles del complejo Ras-GTP. Los resultados de este ensayo muestran que el compuesto **UCM1336** a una concentración 10 μM es capaz de reducir los niveles de Ras-GTP en mayor medida que *cysmethynil* a una concentración 25 μM (Figura 23).

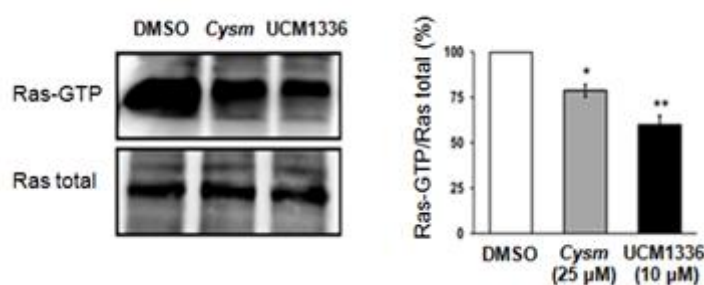


Figura 23. El compuesto **UCM1336** reduce significativamente los niveles de Ras-GTP (forma activa de Ras). El complejo Ras-GTP procedente de células PC-3 tratadas con DMSO, *cysmethynil* a una concentración 25 μM o el compuesto **UCM1336** a una concentración 10 μM fue inmunoprecipitado y visualizado por *western blot*. El diagrama de barras muestra la relación Ras-GTP/Ras total, expresada como porcentaje relativo al ensayo con DMSO. En todos los casos los datos corresponden a la media \pm DE de un total de tres a cinco experimentos independientes; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (test t de Student).

En su conjunto, estos resultados resaltan la importancia del bloqueo de la enzima ICMT como estrategia para el tratamiento de tumores dependientes de Ras. Así, la eficacia en el bloqueo de la actividad ICMT y el carácter citotóxico del compuesto **UCM1336**, permiten que pueda considerarse un excelente candidato para este fin.¹²⁰ Además, este derivado presenta un perfil farmacocinético aceptable, que lo convierte en un candidato susceptible de ser empleado en modelos *in vivo* de tumores dependientes de Ras, proceso que se está llevando a cabo actualmente en colaboración con el grupo del Dr. Faustino Mollinedo del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB - CSIC).

3.6. Estudio del compuesto UCM13239 en un modelo celular de progeria

La progeria se produce debido al procesamiento post-traduccionales defectuosos de la prelámina A, lo cual implica un aumento significativo de la hidrofobicidad de la proteína resultante (progerina) y, por tanto, un incremento en su afinidad por la membrana nuclear interna, lo que favorece su acumulación. Existen evidencias⁹⁵ que relacionan la toxicidad de la progerina con su localización en la membrana, e indican que la liberación de dicha proteína al nucleoplasma disminuye considerablemente su toxicidad, favoreciendo la viabilidad de las células progeroides. Por ello, se estudió la influencia del compuesto **UCM13239** en la línea de fibroblastos progeroides AF3 que portan la mutación $Lmna^{G609G/G609G}$, responsable de la producción de progerina. En primer lugar, para comprobar que el compuesto **UCM13239** no presenta un comportamiento citotóxico en esta línea celular, se determinó su citotoxicidad tanto en la línea AF3 que porta la mutación $Lmna^{G609G/G609G}$ como en su correspondiente línea celular nativa AF3 WT (AF3 *wildtype*), resultando valores de CI_{50} de 73 y 74 μ M, respectivamente.

A continuación, las células se incubaron en presencia de **UCM13239** durante 24 horas, tras las cuales se visualizó la prelámina A (en este caso su forma mutada o progerina) con un anticuerpo que reconoce dicha proteína en su extremo carboxilo terminal. Los resultados obtenidos (Figura 24) muestran cómo en fibroblastos AF3 control sanos, es decir, que no presentan la mutación mencionada, no existe prelámina A ya que ésta ha sido correctamente procesada a lámina A; por el contrario, en fibroblastos AF3 que portan la mutación y expresan progerina, ésta se acumula en la membrana nuclear interna. Dicha acumulación se reduce en las células tratadas con el derivado **UCM13239**, en las que se produce una deslocalización de la progerina hacia el nucleoplasma (Figura 24). Este resultado pone de manifiesto la efectividad del compuesto.

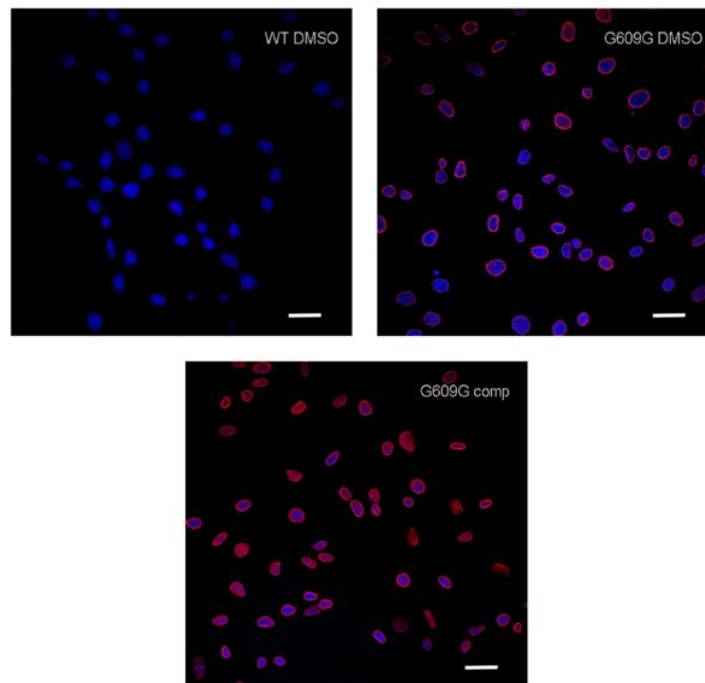


Figura 24. Imágenes de los núcleos obtenidas por microscopía confocal tras tratamiento de fibroblastos AF3 con el inhibidor de ICMT **UCM13239** (25 μ M). La prelámينا A (en rojo) no se encuentra presente en fibroblastos sanos (WT, imagen superior izquierda), y se acumula en la membrana nuclear interna en fibroblastos AF3 Lmna^{G609G/G609G} tratados con DMSO (imagen superior derecha). Esta acumulación se reduce en fibroblastos AF3 Lmna^{G609G/G609G} tratados con 25 μ M del compuesto **UCM1329** (imagen inferior). Los núcleos (en azul) se marcaron con Hoechst 33258. Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado. Barras, 20 μ m.

A continuación, estudiamos si el tratamiento con el compuesto **UCM13239** inducía, además, un aumento en la viabilidad celular de los fibroblastos progeroides. Para ello se realizó una curva de crecimiento celular (Figura 25) y se estudiaron los niveles de la proteína AKT (Figura 26). El compuesto **UCM13239** (25 μ M) indujo un aumento en la viabilidad celular de las células tratadas respecto a las no tratadas (Figura 25) y produjo un incremento en los niveles de proteína AKT fosforilada (p-AKT, Figura 26), relacionada con una estimulación de las vías de proliferación celular.

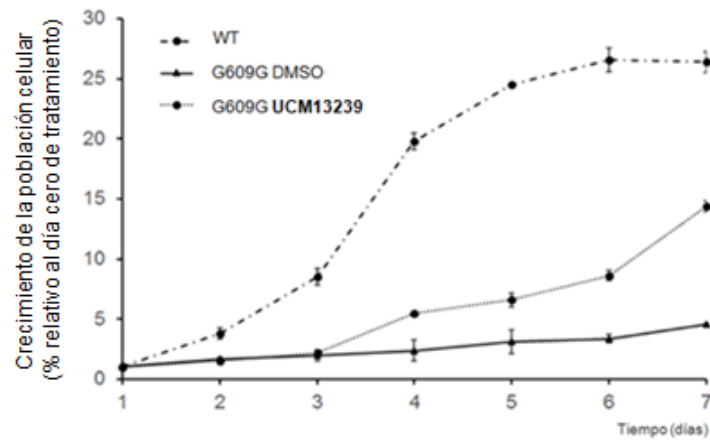


Figura 25. Curvas de crecimiento de fibroblastos AF3 WT y fibroblastos AF3 Lmna^{G609G/G609G} tratados con DMSO o una concentración 25 μ M del compuesto **UCM13239**.

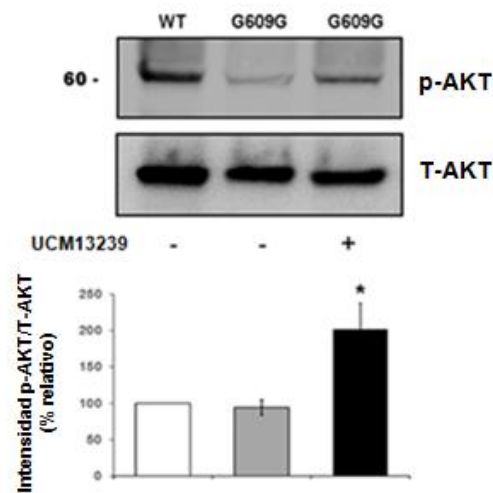


Figura 26. Ensayos de *western blot* representativos correspondientes a los niveles de p-AKT y AKT total (T-AKT) en fibroblastos AF3 WT y fibroblastos AF3 Lmna^{G609G/G609G} tratados con DMSO o con **UCM13239** (25 μ M). El diagrama de barras se corresponde con la intensidad relativa de p-AKT con respecto a T-AKT en cada caso. *, $P < 0.05$ (test t de Student). Los datos corresponden a la media \pm DE de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de la inhibición de la enzima ICMT como una aproximación novedosa en el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de la progeria; siendo el compuesto **UCM13239** un excelente punto de partida para el desarrollo de nuevas estrategias para encontrar una cura para este tipo de enfermedad, proceso que se está llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio.

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Modelo computacional de simulación de los complejos inhibidor-enzima *Hs-ICMT* y generación de un farmacóforo de inhibidores de la enzima

En colaboración con el grupo del Profesor Leonardo Pardo de la Universidad Autónoma de Barcelona, se elaboró un modelo computacional por homología de *Hs-ICMT* (código Uniprot 060725)¹²¹ a partir de la estructura cristalográfica de *Ma-ICMT* (código PDB 4A2N)¹¹⁷ con el programa MODELLER v9.10,¹²² situando el inhibidor AFC y el cosustrato SAM en el sitio de unión propuesto por Yang *et al.*¹¹⁷ Estas estructuras se situaron en una caja rectangular formada por una bicapa lipídica (215 moléculas de 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina, *POPC*) con moléculas de disolvente explícitas (~14.300 moléculas de agua) y una concentración de iones Na⁺ y Cl⁻ de 0.15 M. Las simulaciones computacionales se llevaron a cabo con el paquete de simulación GROMACS 4.6.3.,¹²³ usando el campo de fuerza AMBER99SB, los parámetros de Berger para los lípidos POPC, y el campo de fuerza general Amber (GAFF) y las cargas atómicas derivadas de HF/6-31G* para el ligando. Este procedimiento se encontraba previamente validado.¹²⁴

La generación del modelo de farmacóforo basado en la estructura se llevó a cabo utilizando el programa Discovery Studio 3.5.¹¹⁸ Los parámetros excluidos se añadieron manualmente para representar la superficie de van der Waals de *Hs-ICMT*. Los compuestos de la quimioteca del laboratorio de Química Médica se ajustaron al modelo de farmacóforo usando el programa Discovery Studio 3.5. El valor de la función de ajuste se utilizó para clasificar los compuestos de mejor a peor ajuste.

Todos los estudios de *docking* en el modelo de farmacóforo se llevaron a cabo usando el programa GOLD v5.2, empleando el *Genetic Algorithm* y las funciones de puntuación *Goldscore* y *Chemscore*.¹²⁵ Todas las soluciones de *docking* se visualizaron y

aquellas en las que el grupo carbonilo del inhibidor forma enlace de hidrógeno con la Arg247 fueron seleccionados para llevar a cabo la minimización de su energía.

4.2. Ensayo de actividad de la enzima ICMT

4.2.1. Clonaje y expresión de la enzima ICMT recombinante

Se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Antonio Romero, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Así, el gen que codifica para la proteína ICMT provista de una cola de 6 histidinas en su extremo carboxilo terminal se clonó en células DH5 α electrocompetentes usando el vector pFastBac como vector de transferencia. El ADN plasmídico obtenido, amplificado mediante PCR, se usó para transformar células DH10Bac electrocompetentes. Tras transposición del inserto y selección con kanamicina, gentamicina y tetraciclina, se purificó el ADN bacmídico recombinante obtenido que contiene el gen de la proteína ICMT. A continuación, se transfectaron células de insecto High Five® con el ADN bacmídico obtenido, consiguiendo así la expresión de la proteína ICMT recombinante.

Para el procesado del cultivo celular, se centrifugó éste a baja velocidad (600g) dando lugar, por una parte, al *pellet* de células que contienen la enzima ICMT y, por otro, al sobrenadante que contiene el baculovirus activo (que se utilizó para la infección de posteriores cultivos celulares). El *pellet* de células se incubó, a 4 °C y con agitación, durante 45 min con 1 mL de tampón de lisis (20 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1% de Tritón X-100, cóctel de inhibidores de proteasas) por cada 9 mL de cultivo celular inicial. A continuación se centrifugó la mezcla a baja velocidad (600g) durante 10 min y a 4 °C para precipitar el núcleo y las proteínas insolubles. Se trasvasó entonces el sobrenadante a un tubo de ultracentrifugación y se ultracentrifugó a 125000g durante 60 min y a 4 °C. El *pellet* de membrana enriquecida en la enzima ICMT resultante se resuspendió en un tampón constituido por 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 10% de glicerol y cóctel de inhibidores de proteasas. El homogeneizado de membranas se almacenó a -20 °C hasta su utilización en el ensayo de actividad.

4.2.2. Ensayo de actividad de la enzima ICMT basado en radiactividad

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los compuestos para inhibir la enzima ICMT se realizó un ensayo de actividad basado en radiactividad reproduciendo las condiciones descritas por Baron *et al.*¹¹⁹ Así, los compuestos de interés se ensayaron a una concentración final de 50 μM en un volumen final de 50 μL de tampón de incubación [Hepes 70 mM, NaCl 100 mM, MgCl_2 5 mM, 1,4-ditiotreitol (DTT) 3 mM, pH 7.5], junto con el sustrato BFC (5 μM) y el cosustrato radiactivo [^3H]SAM (5 μM). La mezcla se incubó durante 30 min a 37 °C con agitación. A continuación, se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de 5 μL de Tween20 al 10%. Seguidamente se incorporaron a la mezcla 10 μL de una suspensión de estreptavidina anclada a una resina sólida (Thermo Scientific, 10 μL de la resina resuspendida en 500 μL de PBS) y se agitó a 4 °C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se filtró a vacío a través de filtros de fibra de vidrio (Filtermat A, PerkinElmer), usando un aparato de filtración múltiple FilterMate Unifilter 96-Harvester (PerkinElmer). Los filtros se lavaron 3 veces con PBS y se secaron. A continuación, se fundió inmediatamente sobre el filtro una lámina de centelleo MeltiLex (PerkinElmer). La radiactividad incorporada al producto de la reacción catalizada por la enzima ICMT se determinó por espectrometría de centelleo líquido, usando un contador de centelleo 1450 Microbeta TopCount (PerkinElmer).

4.3. Síntesis

Todos los compuestos de partida, reactivos y disolventes se han adquirido con alto grado de pureza en Sigma-Aldrich, ABCR, Acros, Alfa Aesar, Fluorochem, Scharlab y Panreac. El diclorometano (DCM), el tetrahidrofurano (THF) y el éter dietílico se secaron utilizando un sistema de purificación de disolventes Pure SolvTM Micro 100 Liter. La piridina y la trietilamina se secaron sobre KOH y se destilaron antes de ser utilizadas. Todas las reacciones se han llevado a cabo en atmósfera inerte de argón. La cromatografía en capa fina (CCF) se ha llevado a cabo en cromatofolios de gel de sílice de Merck (Kieselgel 60 F-254) y detección con luz UV (254 nm), disolución etanólica al 5% de ninhidrina o disolución etanólica al 10% de ácido fosfomolibdico. Para la cromatografía en columna se utilizó un equipo de cromatografía flash Varian 971-FP con cartuchos de gel de sílice (Varian, tamaño de partícula 50 μm). Como fase móvil se ha empleado un gradiente que comienza con el disolvente más apolar y termina con la mezcla de disolventes que se especifica en cada caso. Los puntos de fusión (Pf) se han determinado en un aparato electrotérmico Stuart-Scientific en capilares abiertos y no se han corregido. Los espectros

de infrarrojo (IR) se han registrado en un espectrofotómetro Bruker Tensor 27 equipado con un accesorio ATR Specac con un rango de transmisión de $5200\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ para la medida de la reflectancia total atenuada (ATR) y las frecuencias (ν) se expresan en cm^{-1} . Los espectros de ^1H - y ^{13}C -RMN se han obtenido en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de RMN de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y se han registrado a temperatura ambiente en el espectrómetro Bruker Avance 300-AM (^1H , 300 MHz; ^{13}C , 75 MHz; ^{19}F , 282 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) utilizando tetrametilsilano como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hertzios (Hz). En la descripción de las señales de RMN se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), qt (quintuplete), m (multiplete), ap (aparente) y a (ancho). Para la asignación de protones y carbonos de las nuevas estructuras se han llevado a cabo experimentos de RMN bidimensional (HMQC, HMBC y COSY) en compuestos representativos. La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se ha llevado a cabo en un espectrómetro FTMS Bruker APEX Q IV utilizando las técnicas de ionización por electrospray (ESI) o de impacto electrónico (EI), en el CAI de Espectrometría de Masas de la UCM. Las señales correspondientes al ión molecular, el ión molecular menos 1 unidad, más 1 unidad o más 23 unidades se indican como $[\text{M}^+]$, $[(\text{M}-\text{H})^-]$, $[(\text{M}+\text{H})^+]$ o $[(\text{M}+\text{Na})^+]$, respectivamente. Para todos los compuestos finales la pureza se determinó bien mediante análisis elemental (Tabla 11, página 180) o bien mediante HPLC-MS. Los análisis elementales cuantitativos (Anal. C, H, N) se han obtenido en un instrumento LECO CHNS-932 en el CAI de Microanálisis Elemental de la UCM y se encuentran en un intervalo de $\pm 0.5\%$ de los valores teóricos, confirmando una pureza de al menos el 95% para todos los compuestos analizados. En el caso de HPLC-MS, todos los cromatogramas obtenidos mostraron una pureza mayor del 95%. El análisis de HPLC-MS se ha llevado a cabo en un espectrómetro Agilent 1200LC-MSD VL. La separación se ha realizado empleando una de las dos condiciones descritas a continuación, en función de la naturaleza química del compuesto analizado. En la primera de ellas se utiliza una columna Eclipse XDB-C18 ($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$) junto con una precolumna ($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm} \times 12.5\text{ mm}$); la fase móvil empleada consiste en un gradiente de disoluciones A (agua/metanol 95:5) y B (agua/metanol 5:95) con un 0.1% de hidróxido amónico y 0.1% de ácido fórmico como aditivos. En el segundo caso, se utiliza una columna Zorbax SB-C3 column ($5\text{ }\mu\text{m}$, $2.1\text{ mm} \times 50\text{ mm}$) junto con una precolumna ($5\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm} \times 12.5\text{ mm}$); la fase móvil empleada consiste en un gradiente de disoluciones A (agua/acetonitrilo 95:5) y B (agua/acetonitrilo 5:95) con un 0.1% de hidróxido amónico y 0.1% de ácido fórmico como aditivos. En todos los casos se ha usado un flujo constante de 0.5 mL/min , un

tiempo total de 30 minutos y el siguiente gradiente: 0-5 min, 100% A; 15 min, 90% B; 22 min, 100% B; 22-26 min, 100% B; 26-30 min, 100% A. La espectrometría de masas (MS) se ha llevado a cabo utilizando la técnica de ionización ESI en modo de ionización positivo de 100 a 1000 m/z. El voltaje del capilar fue de 3.0 kV y el voltaje del fragmentador de 70 eV. La temperatura del gas secante fue de 350 °C, el flujo de 10 L/min y la presión del nebulizador de 20 psi. Los cromatogramas se han registrado a cuatro longitudes de onda diferentes (210, 230, 254 y 280 nm).

Todos los compuestos de este trabajo se han nombrado siguiendo las reglas dictadas por la IUPAC. En los derivados de β -alanina se ha asignado la prioridad al anillo aromático más sustituido.

4.3.1. Procedimientos generales

4.3.1.1. Síntesis de acrilamidas. Método A

Sobre una disolución de piridina (1.1 equiv.) o trietilamina (1.1 equiv.) y la amina correspondiente (1.0 equiv.) en DCM anhidro (5.0 mL/mmol) se añade gota a gota y a 0 °C, cloruro de acrilóilo (1.1 equiv.). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. El crudo de reacción se lava consecutivamente con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃, CuSO₄ y NaCl. Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ y el disolvente se elimina a presión reducida para dar lugar a la acrilamida deseada.

4.3.1.2. Síntesis de acrilamidas. Método B

Una disolución de la amina correspondiente (1.0 equiv.) y trietilamina (1.0 equiv.) en DCM anhidro (9.0 mL/mmol) se agita a -78 °C durante 10 min. Transcurrido este tiempo se añade, gota a gota, cloruro de acrilóilo (1.0 equiv.). La mezcla se agita durante 3 h, dejando que alcance lentamente una temperatura de 0 °C. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna para obtener la acrilamida de interés.

4.3.1.3. Adición aza-Michael. Método A

Una mezcla formada por la acrilamida correspondiente (1.0 equiv.), octilamina (3.0 equiv.) y DBU (3.0 equiv.) en acetonitrilo anhidro (1.0 mL/mmol de amina) se agita durante 5 h a 60 °C. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna para obtener la amina secundaria de interés.

4.3.1.4. Adición aza-Michael. Método B

Una mezcla formada por la acrilamida o sulfonamida correspondiente (1.5-3.0 equiv.), la amina de interés (1.0 equiv.) y DBU (1.5-3.0 equiv.) en acetonitrilo anhidro (1.0 mL/mmol) se calienta a reflujo durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna para obtener el compuesto de interés.

4.3.1.5. Formación de amidas con agentes de acoplamiento

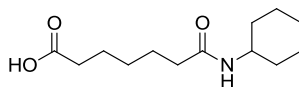
A una disolución del ácido carboxílico correspondiente (1.0 equiv.) en DCM anhidro (4.0 mL/mmol), se añaden EDC (1.0 equiv.) y HOBt (1.0 equiv.). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, se añade una disolución de la amina secundaria correspondiente (1.0 equiv.) en DCM anhidro (2.0 mL/mmol) y se agita a temperatura ambiente durante toda la noche.* El crudo de reacción se lava con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y NaCl, consecutivamente. Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna, obteniéndose las diamidas de interés.

*Los ácidos 4-acetamidobenzoico, 2-pirrolcarboxílico y 3-pirrolcarboxílico no se dejan activando con los agentes de condensación durante una hora, sino que la amina **15** se adiciona inmediatamente después del ácido carboxílico.

4.3.2. Síntesis de los compuestos UCM1333 y UCM13140

Ácido 7-ciclohexilamino-7-oxoheptanoico (**1**)

Una disolución de ácido heptanodioico (500 mg, 3.1 mmol) en anhídrido acético (1.1 mL, 11.5 mmol) se calienta a reflujo durante 1 h. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se redisuelve en THF anhidro (5.0 mL). Sobre esta disolución se añade ciclohexilamina (313 mg, 3.1 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación, sobre el crudo de reacción se añade agua y se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos obtenidos se secan sobre Na₂SO₄ y el disolvente se elimina a presión reducida. Las impurezas del residuo resultante se eliminan por precipitación en éter dietílico frío y filtración. Se elimina el disolvente a presión reducida para obtener el compuesto **1** (748 mg) como un aceite con rendimiento cuantitativo.



IR (ATR, cm^{-1}): 3297, 3085 (OH, NH), 1729, 1621, 1551 (COO, CON).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): Mezcla de rotámeros A:B, 2:1; 1.03-1.19 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 1.28-1.48 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{ciclo}}$, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}$), 1.57-1.73 (m, 6H, $2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.88-1.96 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.14 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2CON rotámero A), 2.36 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2CON rotámero B), 2.46 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2COO), 3.69-3.81 (m, 1H, CH_{ciclo}), 5.38 (s a, 1H, NH).

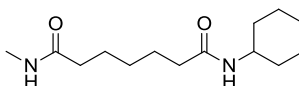
$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 23.7, 23.9, 24.5 (CH_2) $_3\text{CH}_2\text{CO}$), 25.0 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 25.6 ($\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 33.3 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 33.9 (CH_2CON rotámero B), 35.0 (CH_2COO), 36.7 (CH_2CON rotámero A), 48.3, 48.4 (CH_{ciclo} rotámeros A y B), 169.5 (COO), 177.0, 177.1 (CON rotámeros A y B).

MS (ESI): 239.9 [(M-H)].

HPLC-MS, t_r (min): 11.20.

N-Ciclohexil-N'-metilheptanodiamida (UCM1333)

Sobre una disolución del ácido **1** (300 mg, 1.2 mmol) en DCM anhidro (5.6 mL) se añade EDC (559 mg, 2.9 mmol) y HOBt (386 mg, 2.9 mmol). La mezcla se agita durante 1 h a temperatura ambiente. Se añade gota a gota una disolución de metilamina 1 M en THF (4.0 mL, 4.0 mmol) y el conjunto se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. El crudo de reacción se lava con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl , consecutivamente. Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo obtenido se redissuelve en éter dietílico frío, donde la diamida deseada precipita como un sólido, que se aísla por filtración para obtener el derivado **UCM1333** (64 mg) con un rendimiento del 21%.



Pf: 127-129 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3332, 3325 (NH), 1638, 1556 (CON).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 1.03-1.19 (m, 4H, $2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 1.23-1.40 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{ciclo}}$, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CO}$), 1.56-1.71 (m, 6H, $2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.84-1.88 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.12 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.16 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.76 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H, CH_3), 3.65-3.76 (m, 1H, CH_{ciclo}), 5.58 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH), 5.91 (s a, 1H, NH).

Parte experimental

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 25.0 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 25.2, 25.3, 25.6 ($(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CO}$), 26.4 (CH_3), 28.6 ($\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 33.3 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 36.2, 36.6 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 48.2 (CH_{ciclo}), 172.2, 173.8 (2CO).

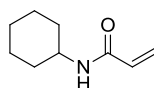
MS (ESI): 254.9 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 19.80.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$ [(M+Na)⁺]: 277.1886. Encontrada: 277.1873.

N-Ciclohexilacrilamida (2)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (179 μL , 2.2 mmol), piridina (178 μL , 2.2 mmol) y ciclohexilamina (230 μL , 2.0 mmol) como un sólido (224 mg) con un rendimiento del 73%.



Rf: 0.17 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

Pf: 114-116 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3287 (NH), 1655, 1622 (CON), 1551 (C=C).

^1H -RMN ($\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 1.05-1.32 (m, 5H, $5 \times \frac{1}{2}\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 1.53-1.57 (m, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 1.65-1.76 (m, 4H, $4 \times \frac{1}{2}\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 3.53-3.63 (m, 1H, CHN), 5.53 (dd, $J = 9.9, 2.3$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.04 (dd, $J = 17.0, 2.3$ Hz, 1H, CH=), 6.20 (dd, $J = 17.1, 9.9$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 7.94 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH).

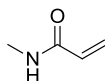
^{13}C -RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, δ): 24.5 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 25.1 ($\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 32.3 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 47.3 (CHN), 124.8 ($\text{CH}_2=$), 131.9 (CH=), 163.5 (CO).

MS (ESI): 154.0 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 18.01.

N-Metilacrilamida (3)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.2. a partir de metilamina (1 M en THF, 13.8 mL, 13.8 mmol), trietilamina (385 μL , 2.8 mmol) y cloruro de acrilóilo (223 μL , 2.8 mmol) como un aceite (238 mg) con un rendimiento cuantitativo.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.33 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

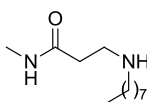
IR (ATR, cm^{-1}): 3283 (NH), 1659, 1623, 1558 (CON, C=C).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 2.90 (d, $J = 4.9$ Hz, 3H, CH_3), 5.64 (d, $J = 10.2$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 5.72 (s a, 1H, NH), 6.10 (dd, $J = 17.0, 10.2$ Hz, 1H, $1\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.28 (d, $J = 16.9$, 1H, $\text{CH}=\text{}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 26.3 (CH_3), 126.1 ($\text{CH}_2=$), 130.8 ($\text{CH}=\text{}$), 166.4 (CO).

***N*¹-Metil-*N*³-octil- β -alaninamida (4)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.3. a partir de la acrilamida **3** (51 mg, 0.6 mmol), octilamina (297 μL , 1.8 mmol) y DBU (264 μL , 1.8 mmol) como un aceite (109 mg) con un rendimiento del 85%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.35 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3278 (NH), 1645, 1559 (CON).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.89 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.29 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.45-1.54 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.38 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.62 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.78 (d, $J = 4.7$ Hz, 3H, CH_3N), 2.88 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.92 (s a, 1H, NH).

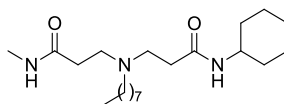
$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.2 (CH_3CH_2), 22.8 (CH_2), 26.0 (CH_3N), 27.0, 27.4, 29.4, 29.5, 31.9 (5CH_2), 35.3 (CH_2CO), 49.5, 50.6 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 173.4 (CO).

MS (ESI): 215.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 6.97.

***N*¹-Ciclohexil-*N*³-[3-(metilamino)-3-oxopropil]-*N*³-octil- β -alaninamida (UCM13140)**

Obtenida, usando el procedimiento 4.3.1.4., a partir de la acrilamida **2** (132 mg, 0.9 mmol), la amina **4** (123 mg, 0.6 mmol) y DBU (129 μL , 0.9 mmol) como un aceite (69 mg) con un rendimiento del 21%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.15 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3308 (NH), 1646, 1558 (CON).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.88 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.05-1.47 (m, 16H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, $4 \times \frac{1}{2}\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 1.60-1.72 (m, 4H, $4 \times \frac{1}{2}\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 1.87-1.94 (m, 2H, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 2.29 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.35 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.43 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.75 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.78 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H, CH_3N), 3.66-3.81 (m, 1H, CHN), 6.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, NH), 6.93 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3CH_2), 22.7 (CH_2), 24.9 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 25.6 ($\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 26.0 (CH_3N), 26.7, 27.6, 29.3, 29.5, 31.8 (5CH_2), 33.2 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 33.6 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 48.1 (CHN), 49.8, 49.9 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.4 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 171.1, 172.8 (2CO).

MS (ESI): 367.9 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 8.23.

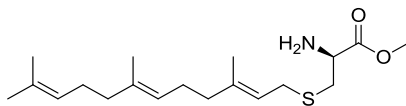
HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_2$ [(M+H) $^+$]: 368.3271. Encontrada: 368.3245.

4.3.3. Síntesis de BFC (7)

S-[(2E,6E)-3,7,11-Trimetildodeca-2,6,10-trienil]-L-cisteinato de metilo (5)

Este compuesto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento previamente descrito por Brown *et al.* y sus datos espectroscópicos coinciden con los descritos.¹²⁶

Sobre una disolución de NH_3 (3 M en metanol, 10.5 mL, 31.5 mmol) se adiciona a 0 °C cloruro de farnesilo (338 mg, 1.4 mmol) y clorhidrato de L-cisteinato de metilo (221 mg, 1.4 mmol). La mezcla de reacción se agita durante 3 h a 0 °C. A continuación, se deja que alcance la temperatura ambiente y se agita durante una hora más. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se redisuelve en agua y se extrae con éter dietílico. La fracción orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 7:3) para obtener el derivado **5** (466 mg) como un aceite con un rendimiento del 98%.

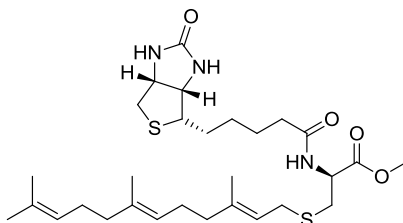


Rf: 0.17 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , δ): 1.61 (s, 6H, 2CH_3), 1.67 (s, 3H, CH_3), 1.70 (s, 3H, CH_3), 1.95-2.15 (m, 8H, $2(\text{CH}_2)_2\text{C}=\text{}$), 2.72 (dd, $J = 13.8, 7.4$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{SCH}_2\text{CHN}$), 2.89 (dd, $J = 13.9, 5.1$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{SCH}_2\text{CHN}$), 3.20 (sistema AB, $J = 13.2, 7.9$ Hz, 2H, $=\text{CHCH}_2\text{S}$), 3.69-3.74 (m, 1H, CHCO), 3.75 (s, 3H, CH_3O), 5.07-5.14 (m, 2H, $2\text{CH}=\text{C}$), 5.23 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{C}$).

***N*-Biotinil-*S*-[(*2E,6E*)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil]-*L*-cisteinato de metilo (**6**)**

Una suspensión de biotina (423 mg, 1.7 mmol), HOBt (234 mg, 1.7 mmol) y tamices moleculares (previamente activados) en DMF anhidra (10.0 mL) se agita a 60 °C durante 20 min hasta la completa disolución de la biotina. Tras enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente, se adiciona gota a gota una disolución de DCC (393 mg, 1.9 mmol) en DCM anhidro (1.0 mL). La mezcla de reacción se agita durante 3 h a temperatura ambiente. A continuación, se añade una disolución del éster **5** (392 mg, 1.2 mmol) y DMAP (21 mg, 0.2 mmol) en DMF anhidra (2.0 mL), y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtra a través de un filtro de pliegues, lavando con acetato de etilo, y el disolvente se elimina a presión reducida para eliminar la DMF. El residuo obtenido se redissuelve en acetato de etilo y se lava con una disolución saturada de NaHCO_3 . El extracto orgánico se seca sobre Na_2SO_4 , el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (DCM/metanol, 8:2) para obtener el compuesto **6** (489 mg) como un aceite con un rendimiento del 72%.



Rf: 0.25 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3271 (NH), 1741, 1701, 1539 (COO, CON), 1440 (C=C).

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , δ): 1.39-1.52 (m, 2H, CH_2 Biotina), 1.55-1.81 (m, 16H, 4CH_3 , 2CH_2 Biotina), 1.95-2.14 (m, 8H, $2(\text{CH}_2)_2\text{C}=\text{}$), 2.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.67-2.75 (m, 2H, $\frac{1}{2}\text{SCH}_2\text{CHN}$, $\frac{1}{2}\text{CH}_2\text{S}$ Biotina), 2.90-2.98 (m, 2H, $\frac{1}{2}\text{SCH}_2\text{CHN}$, $\frac{1}{2}\text{CH}_2\text{S}$ Biotina), 3.11-3.26 (m, 3H, $=\text{CHCH}_2\text{S}$, CHS), 3.73 (s, 3H, CH_3O), 4.31 (dd, $J = 7.8, 4.4$ Hz, 1H, CHN Biotina),

4.49 (dd, $J = 7.8, 4.6$ Hz, 1H, CHN Biotina), 4.60 (dd, $J = 9.0, 5.0$ Hz, 1H, CHCO), 5.07-5.14 (m, 2H, 2CHC=), 5.22 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH=C).

^{13}C -RMN (CD_3OD , δ): 16.2, 16.3, 17.8, 26.0 (4CH₃), 26.7 (CH₂ Biotina), 27.4, 27.8 (2CH₂CH=), 29.4, 29.6 (2CH₂ Biotina), 30.1(=CHCH₂S), 33.2 (SCH₂CHN), 36.4 (CH₂CO), 40.7, 40.9 (2CH₂C=), 41.1 (CH₂S Biotina), 52.9 (CH₃O), 53.4 (CHCO), 57.0 (CHS), 61.6, 63.3 (2CHN Biotina), 121.5, 125.1, 125.4 (3CH=C), 132.1, 136.3, 140.6 (3C=CH), 166.1 (NCON), 172.9 (COO), 176.1 (CON).

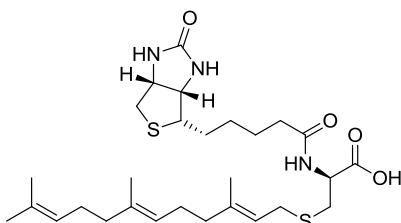
MS (ESI): 566.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 14.37.

***N*-Biotinil-*S*-[(2*E*,6*E*)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil]-*L*-cisteína (BFC, 7)**

Este compuesto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento previamente descrito por Donelson *et al.* y sus datos espectroscópicos coinciden con los descritos.¹²⁷

Sobre una disolución del éster **6** (60 mg, 0.1 mmol) en metanol (3.2 mL) se añade lentamente a 0 °C una disolución 7 M de NaOH en MeOH (1.4 mmol, 0.2 mL). La mezcla se agita durante 90 min a 0 °C. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se redissuelve en agua y se lava con DCM. La fase acuosa se acidifica hasta pH = 5-6, precipitando un sólido blanco que se extrae con acetato de etilo. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ y el disolvente se elimina a vacío para obtener el compuesto **7** (42 mg) como un sólido con un rendimiento del 77%.



R_f: 0.12 (acetato de etilo/metanol, 8:2).

Pf: 148-150 °C.

IR (ATR, cm⁻¹): 3354, 3274 (NH, OH), 1705, 1656, 1536 (COO, CON), 1456 (C=C).

^1H -RMN (CD_3OD , δ): 1.43-1.81 (m, 18H, 4CH₃, 3CH₂ Biotina), 1.95-2.14 (m, 8H, 2(CH₂)₂C=), 2.29 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH₂CO), 2.68-2.75 (m, 2H, ½SCH₂CHN, ½CH₂S Biotina), 2.92 (dd, $J = 12.8, 4.9$ Hz, 1H, ½SCH₂CHN), 3.01 (dd, $J = 14.0, 4.4$ Hz, 1H, ½CH₂S Biotina), 3.11-3.28 (m, 3H, =CHCH₂S, CHS), 4.31 (dd, $J = 7.8, 4.6$ Hz, 1H, CHN).

Biotina), 4.49 (dd, $J = 7.8, 4.8$ Hz, 1H, CHN Biotina), 4.56-4.60 (m, 1H, CHCO), 5.07-5.14 (m, 2H, 2CH=C), 5.22 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH=C).

^{13}C -RMN (CD_3OD , δ): 16.2, 16.3, 17.8, 25.9 (4CH₃), 26.8 (CH₂ Biotina), 27.5, 27.8 (2CH₂CH=), 29.4, 29.5 (2CH₂ Biotina), 30.2 (=CHCH₂S), 33.5 (SCH₂CHN), 36.5 (CH₂CO), 40.8, 40.9 (2CH₂C=), 41.1 (CH₂S Biotina), 53.3 (CHCO), 57.0 (CHS), 61.7, 63.3 (2CHN Biotina), 121.6, 125.2, 125.5 (3CH=C), 132.1, 136.3, 140.6 (3C=CH), 173.0 (NCON), 174.1 (COO), 176.1 (CON).

MS (ESI): 552.1 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 12.72.

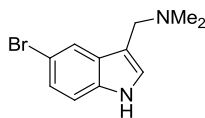
HRMS (ESI): Calculada para C₂₈H₄₄N₃O₄S₂ [(M-H)⁻]: 550.2778. Encontrada: 550.2803.

4.3.4. Síntesis de *cysmethynil*

Este compuesto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento previamente descrito por Winter-Vann *et al.* y los datos espectroscópicos de todos los intermedios y de *cysmethynil* coinciden con los previamente descritos.⁷¹

***N*-[(5-Bromo-1*H*-indol-3-il)metil]-*N,N*-dimetilamina (**8**)**

Sobre una disolución de 1,4-dioxano (10.4 mL) y ácido acético (10.4 mL) se añaden, de forma secuencial y a 0 °C, formaldehído (0.8 mL, 11.1 mmol), H₂O (0.8 mL), dimetilamina (1.4 mL, 11.1 mmol) y una disolución de 5-bromoindol (2.0 g, 10.1 mmol) en 1,4-dioxano (10.4 mL). La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 2 h, tras lo cual se retira el baño de hielo y se agita la mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, el crudo de reacción se diluye con H₂O (130 mL) y se añade carbón activo (600 mg) y celita (600 mg). Esta mezcla se agita durante 10 min, se filtra y se añade una disolución acuosa de NaOH al 20% (200 mL) al filtrado para precipitar el producto deseado. El precipitado resultante se filtra a vacío, se lava con agua y se seca a presión reducida para obtener el producto deseado como un sólido (2.10 g) con un rendimiento del 83%. Los datos espectroscópicos corresponden con los previamente descritos.⁷¹

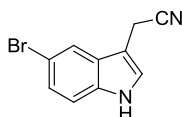


Pf: 149-150 °C (Lit.⁷¹ 149-152 °C).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2.27 (s, 6H, 2CH₃), 3.57 (s, 2H, CH₂), 7.06 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.20-7.29 (m, 2H, 2CH_{Ar}), 7.84 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, CH_{Ar}), 8.24 (s a, 1H, NH).

(5-Bromo-1*H*-indol-3-il)acetonitrilo (9)

Sobre una disolución de sulfato de dimetilo (7.6 mL, 39.5 mmol) en THF (5.4 mL) y ácido acético (160 μL) se añaden, gota a gota, una disolución del bromoindol **8** (2.0 g, 7.9 mmol) en THF (13.8 mL) y ácido acético (160 μL). La mezcla de reacción se agita a 10 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se filtra a vacío, se lava con éter dietílico y se seca a presión reducida. El precipitado obtenido se adiciona sobre una disolución de KCN (1.50 g, 23.7 mmol) en H₂O (20.0 mL) y la mezcla se agita a 60-70 °C durante 1 h. A continuación, tras enfriar el crudo hasta alcanzar la temperatura ambiente, éste se extrae con éter dietílico y se elimina el disolvente a presión reducida para obtener el producto deseado como un sólido (1.76 g) con un rendimiento del 95%.

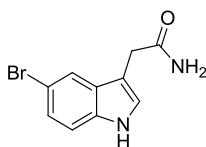


Pf: 100-101 °C (Lit.⁷¹ 100-102 °C).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 3.80 (s, 2H, CH₂), 7.23-7.76 (m, 3H, 3CH_{Ar}), 7.75 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.23 (s a, 1H, NH).

2-(5-Bromo-1*H*-indol-3-il)acetamida (10)

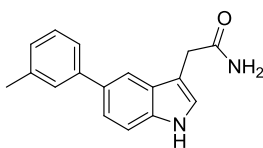
Sobre una disolución del nitrilo **9** (1.8 g, 7.5 mmol) en *tert*-butanol (16.0 mL) se añade, bajo atmósfera de argón, KOH (4.00 g, 60.2 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 1.5 h. A continuación, el crudo de reacción se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente, tras lo cual se adiciona H₂O (16.0 mL) sobre la mezcla y se acidifica con una disolución acuosa de HCl 1 M (65 mL), apareciendo un precipitado pardo. La suspensión resultante se filtra, el sólido se lava con H₂O y se seca a presión reducida para obtener el producto deseado como un sólido (1.40 g) con un rendimiento del 74%.



$^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$, δ): 3.44 (s, 2H, CH_2), 6.86 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.15-7.38 (m, 4H, 2CH_{Ar} , NH_2), 7.73 (s, 1H, CH_{Ar}), 11.08 (s a, 1H, NH).

2-[5-(3-Metilfenil)-1H-indol-3-il]acetamida (**11**)

A una suspensión del bromoindol **10** (1.40 g, 5.4 mmol) en tolueno anhidro (107 mL) se le añade $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (350 mg, 0.3 mmol) y la mezcla se agita durante 1 h a temperatura ambiente. Tras esto se adiciona sobre la mezcla de reacción una disolución de ácido *m*-tolilborónico (1.09 g, 8.0 mmol) en etanol (20 mL) y una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (50 mL). El conjunto se refluxe durante toda la noche. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se lava con una disolución saturada de NaCl y la fracción orgánica se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna ($\text{DCM}/\text{metanol}$, 1:1) para obtener el producto deseado como un sólido (328 mg) con un rendimiento del 23%.

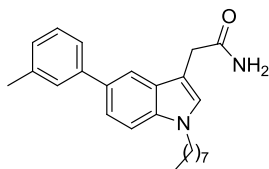


$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 2.40 (s, 3H, CH_3), 3.70 (s, 2H, CH_2), 5.49 (s a, 1H, NH), 5.62 (s a, 1H, NH), 7.05-7.42 (m, 7H, 7CH_{Ar}), 7.68 (s, 1H, CH_{Ar}), 8.23 (s a, 1H, NH).

2-[5-(3-Metilfenil)-1-octil-indol-3-il]acetamida (*cysmethynil*)

Sobre una suspensión de NaH (15 mg, 0.6 mmol) en DMF anhidra (0.8 mL) se añade, gota a gota y bajo atmósfera de argón, una disolución del indol **11** (139 mg, 0.5 mmol) y la mezcla se agita durante 1.5 h a temperatura ambiente. Se adiciona sobre la mezcla 1-bromooctano (276 μL , 1.6 mmol) y se agita a 55 $^\circ\text{C}$ durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se adiciona sobre el crudo de reacción agua fría (23 mL) y se agita durante 10 min. La mezcla resultante se extrae con éter dietílico y se lava con una disolución saturada de NaCl . El extracto orgánico se seca sobre Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a

presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (DCM/metanol, 95:5) para obtener el producto deseado como un aceite (81 mg) con un rendimiento del 43%.



$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.25-1.34 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.86 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.44 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}_{\text{Ar}}$), 3.76 (s, 2H, CH_2CO), 4.11 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 5.60 (s a, 1H, NH), 5.71 (s a, 1H, NH), 7.08 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.14 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7.31-7.53 (m, 5H, 5CH_{Ar}), 7.76 (s, 1H, CH_{Ar}).

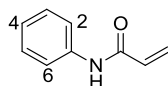
HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{ONa}$ [(M+Na) $^+$]: 399.2412. Encontrada: 399.2408.

4.3.5. Síntesis de los compuestos 12 y 13

N-Fenilacrilamida (14)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (446 μL , 5.5 mmol), piridina (446 μL , 5.5 mmol) y anilina (458 μL , 5.0 mmol) como un sólido (736 mg) con rendimiento cuantitativo.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹²⁸



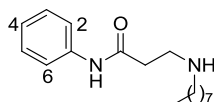
R_f : 0.57 (DCM/metanol, 95:5).

P_f : 107-108 $^\circ\text{C}$. (Lit.¹²⁹ 105-106 $^\circ\text{C}$).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 5.71 (dd, $J = 9.6, 2.0$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.31 (dd, $J = 16.9, 9.7$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 6.42 (dd, $J = 16.9, 1.9$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 7.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.30 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_3, H_5), 7.60 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_2, H_6), 8.16 (s a, 1H, NH).

***N*¹-Fenil-*N*³-octil-β-alaninamida (15)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.3. a partir de la acrilamida **14** (200 mg, 1.4 mmol), octilamina (674 μL, 4.1 mmol) y DBU (610 μL, 4.1 mmol) como un aceite (294 mg) con un rendimiento del 76%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 1:1, a acetato de etilo.

Rf: 0.12 (acetato de etilo).

IR (ATR, cm⁻¹): 3297 (NH), 1667, 1551 (CON), 1601, 1497, 1444 (Ar).

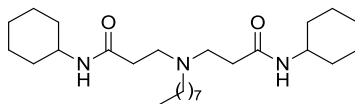
¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.86-0.88 (m, 3H, CH₃), 1.29 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.54-1.58 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.48 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH₂CO), 2.69 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, (CH₂)₆CH₂N), 2.97 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, COCH₂CH₂N), 3.48 (s, 1H, NH), 7.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₄), 7.29 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H₂, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.1 (CH₃), 22.7, 27.5, 29.3, 29.5, 30.1, 31.8 ((CH₂)₆CH₃), 36.1 (CH₂CO), 45.5 (CH₂N), 49.3 ((CH₂)₆CH₂N), 119.7 (C₂, C₆), 123.6 (C₄), 128.9 (C₃, C₅), 138.8 (C₁), 171.1 (CO).

MS (ESI): 277.2 [(M+H)⁺].

***N*¹-Ciclohexil-*N*³-[3-(ciclohexilamino)-3-oxopropil]-*N*³-octil-β-alaninamida (12)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **2** (118 mg, 0.8 mmol), octilamina (42 μL, 0.3 mmol) y DBU (115 μL, 0.8 mmol) como un aceite (35 mg) con un rendimiento del 27%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.21 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm⁻¹): 3283 (NH), 1640, 1546 (CON).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.87 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 1.05-1.48 (m, 22H, (CH₂)₆CH₃, 5x¹/₂CH₂ciclo), 1.59-1.72 (m, 6H, 6x¹/₂CH₂ciclo), 1.86-1.91 (m, 4H, 4x¹/₂CH₂ciclo), 2.29 (t, *J* =

6.5 Hz, 4H, 2CH₂CO), 2.43 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, (CH₂)₆CH₂N), 2.75 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, 2COCH₂CH₂N), 3.67-3.79 (m, 2H, 2CHN), 6.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 2NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃), 22.9 (CH₂), 25.0 (4CH_{2ciclo}), 25.7 (2CH_{2ciclo}), 27.1, 27.8, 29.4, 29.7, 32.0 (5CH₂), 33.3 (4CH_{2ciclo}), 33.4 (2CH₂CO), 48.1 (2CHN), 49.9 (2CH₂N), 53.6 ((CH₂)₆CH₂N), 171.1 (2CO).

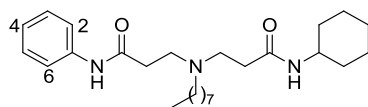
MS (ESI): 435.8 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 9.98.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₆H₅₀N₃O₂ [(M+H)⁺]: 436.3897. Encontrada: 436.3866.

N³-[3-(Ciclohexilamino)-3-oxopropil]-N¹-fenil-N³-octil-β-alaninamida (13)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **2** (83 mg, 0.5 mmol), la amina **15** (100 mg, 0.4 mmol) y DBU (81 μL, 0.5 mmol) como un aceite (58 mg) con un rendimiento del 34%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

R_f: 0.26 (acetato de etilo).

IR (ATR, cm⁻¹): 3298 (NH), 1646, 1547 (CON), 1601, 1499, 1444 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.87 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 0.94-1.11 (m, 3H, 3x½CH_{2ciclo}), 1.23-1.26 (m, 12H, (CH₂)₅CH₃, 2x½CH_{2ciclo}), 1.50-1.66 (m, 5H, CH₂(CH₂)₅CH₃, 3x½CH_{2ciclo}), 1.76-1.81 (m, 2H, 2x½CH_{2ciclo}), 2.37 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂CO), 2.49-2.56 (m, 4H, CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.82 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, COCH₂CH₂N), 2.87 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, COCH₂CH₂N), 3.61-3.73 (m, 1H, CHN), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₄), 7.30 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H₂, H₆), 9.74 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.1 (CH₃), 22.6 (CH₂), 24.9 (2CH_{2ciclo}), 25.4 (CH₂), 26.9 (CH_{2ciclo}), 27.7, 29.3, 29.6, 31.8 (4CH₂), 33.1 (2CH_{2ciclo}), 33.9, 34.3 (2CH₂CO), 48.2 (CHN), 49.4, 50.2 (2CH₂N), 53.7 ((CH₂)₆CH₂N), 119.8 (C₂, C₆), 123.8 (C₄), 128.8 (C₃, C₅), 138.5 (C₁), 170.6, 170.8 (2CO).

MS (ESI): 430.3 [(M+H)⁺].

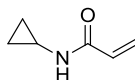
HPLC-MS, t_r (min): 9.27.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₆H₄₄N₃O₂ [(M+H)⁺]: 430.3428. Encontrada: 430.3408.

4.3.6. Síntesis de las diamidas 16-23

N-Ciclopropilacrilamida (24)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (223 μL , 2.8 mmol), trietilamina (385 μL , 2.8 mmol) y ciclopropilamina (175 μL , 2.5 mmol) como un sólido (203 mg) con un rendimiento del 73%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 3:7.

Rf: 0.32 (hexano/acetato de etilo, 3:7).

Pf: 52-54 $^{\circ}\text{C}$.

IR (ATR, cm^{-1}): 3263 (NH), 1656, 1623 (CON), 1537 (C=C).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.52-0.58 (m, 2H, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 0.77-0.87 (m, 2H, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 2.75-2.85 (m, 1H, CH_{ciclo}), 5.62 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 5.85 (s a, 1H, NH), 6.04 (dd, $J = 17.0, 10.3$ Hz, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.28 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{}$).

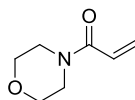
^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 6.4 ($2\text{CH}_{2\text{ciclo}}$), 22.7 (CH_{ciclo}), 126.0 (CH_2), 131.0 (CH), 167.4 (CO).

MS (ESI): 111.9 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 4.30.

4-Acridoilmorfolina (25)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (179 μL , 2.2 mmol), piridina (178 μL , 2.2 mmol) y morfolina (173 μL , 2.0 mmol) como un sólido (192 mg) con un rendimiento del 68%.



Rf: 0.17 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3480 (NH), 1709, 1642 (CON), 1609 (CON, C=C).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 3.58 (m, 2H, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_2\text{N}$), 3.71 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{O}$, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_2\text{N}$), 5.73 (dd, $J = 10.4, 1.8$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.33 (dd, $J = 16.8, 1.9$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 6.55 (dd, $J = 16.8, 10.4$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$).

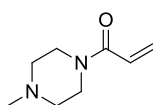
^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 42.2, 46.2 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 66.8 ($2\text{CH}_2\text{O}$), 127.0 ($\text{CH}=\text{}$), 128.4 ($\text{CH}_2=\text{}$), 165.5 (CO).

MS (ESI) : 141.9 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

HPLC-MS , t_r (min): 12.87.

1-Aciloil-4-metilpiperazina (26)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de aciloilo (179 μL , 2.2 mmol), piridina (178 μL , 2.2 mmol) y 1-metilpiperazina (222 μL , 2.0 mmol) como un aceite (216 mg) con un rendimiento del 70%.



R_f : 0.24 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

$\text{IR (ATR, cm}^{-1}\text{)}$: 3456 (NH), 1641 (CON), 1605 ($\text{C}=\text{C}$).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.44 (t, $J = 5.0$ Hz, 4H, $2\text{CH}_2\text{NCH}_3$), 3.60, 3.73 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{NCO}$), 5.70 (dd, $J = 10.5, 2.0$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=\text{}$), 6.29 (dd, $J = 16.8, 2.0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 6.57 (dd, $J = 16.8, 10.5$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=\text{}$).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 41.8, 45.7 ($2\text{CH}_2\text{NCO}$), 46.0 (CH_3), 54.6, 55.2 ($2\text{CH}_2\text{NCH}_3$), 127.4 ($\text{CH}=\text{}$), 127.9 ($\text{CH}_2=\text{}$), 165.4 (CO).

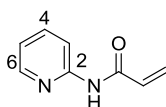
MS (ESI) : 155.0 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

HPLC-MS , t_r (min): 3.04.

N-Piridin-2-ilacrilamida (27)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.2. a partir de cloruro de aciloilo (223 μL , 2.8 mmol), trietilamina (386 μL , 2.8 mmol) y 2-aminopiridina (260 mg, 2.8 mmol) como un sólido (282 mg) con un rendimiento del 68%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³⁰



Cromatografía: acetato de etilo.

Rf: 0.44 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

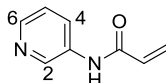
Pf: 66-68 °C. (Lit.¹³⁰ 71 °C).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 5.84 (dd, *J* = 10.2, 1.2 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.28 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H, CH=), 6.48 (dd, *J* = 16.9, 1.1 Hz, 1H, ½CH₂=), 7.08 (ddd, *J* = 7.2, 5.0, 0.9 Hz, 1H, H₅), 7.75 (td, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1H, H₄), 8.23 (s a, 1H, NH), 8.28-8.34 (m, 2H, H₃, H₆).

***N*-Piridin-3-ilacrilamida (28)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.2. a partir de cloruro de acrilóilo (446 µL, 5.5 mmol), trietilamina (771 µL, 5.5 mmol) y 3-aminopiridina (520 mg, 5.5 mmol) como un sólido (464 mg) con un rendimiento del 57%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³⁰



Cromatografía: acetato de etilo a acetato de etilo/metanol, 9:1.

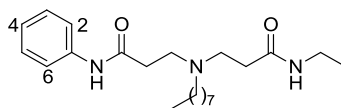
Rf: 0.25 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

Pf: 121-123 °C. (Lit.¹³⁰ 118-121 °C).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 5.84 (dd, *J* = 10.1, 1.2 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.29 (dd, *J* = 16.9, 10.2 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.49 (dd, *J* = 16.8, 1.2 Hz, 1H, CH=), 7.31 (dd, *J* = 8.3, 4.8 Hz, 1H, H₅), 7.59 (s a, 1H, NH), 8.28 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H₄), 8.38 (dd, *J* = 4.7, 1.3 Hz, 1H, H₆), 8.61 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, H₂).

***N*³-[3-(Etilamino)-3-oxopropil]-*N*¹-fenil-*N*³-octil-β-alaninamida (16)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de *N*-etilacrilamida (54 mg, 0.5 mmol), la amina **15** (100 mg, 0.4 mmol) y DBU (81 µL, 0.5 mmol) como un aceite (78 mg) con un rendimiento del 52%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 7:3.

Rf: 0.19 (acetato de etilo).

IR (ATR, cm⁻¹): 3296 (NH), 1645, 1549 (CON), 1601, 1498, 1444 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.86 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7$), 1.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$), 1.22-1.29 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.35 (t, 2H, CH_2CO), 2.47-2.53 (m, 4H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$, CH_2CO), 2.78 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.85 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.12-3.21 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$), 5.98 (s a, 1H, NH), 7.07 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.30 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 9.72 (s a, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.2 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6$), 14.8 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$), 22.8, 27.0, 27.8, 29.4, 29.7, 32.0 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 34.0, 34.46 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 34.53 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}$), 49.6, 50.5 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 119.9 (C_2 , C_6), 123.9 (C_4), 129.0 (C_3 , C_5), 138.6 (C_1), 170.9, 171.5 (2CO).

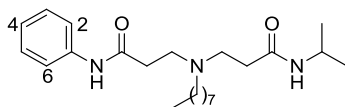
MS (ESI) : 376.2 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS , t_r (min): 8.79.

HRMS (ESI) : Calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_2$ [(M) $^+$]: 375.2880. Encontrada: 375.2882.

N^1 -Fenil- N^3 -[3-(isopropilamino)-3-oxopropil]- N^3 -octil- β -alaninamida (17)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de *N*-isopropilacrilamida (98 mg, 0.9 mmol), la amina **17** (160 mg, 0.6 mmol) y DBU (130 μL , 0.9 mmol) como un aceite (68 mg) con un rendimiento del 29%.



Cromatografía : acetato de etilo.

Rf : 0.17 (acetato de etilo).

$\text{IR (ATR, cm}^{-1}\text{)}$: 3299 (NH), 1643, 1548 (CON), 1602, 1499, 1444 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.81 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.00 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.18-1.24 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.46 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.29 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.42-2.49 (m, 4H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$, CH_2CO), 2.74 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.80 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.90-4.01 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 5.99 (s a, 1H, NH), 7.01 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.24 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.49 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 9.83 (s a, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3CH_2), 22.6 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 22.7, 26.9, 27.6, 29.3, 29.5, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 33.8, 34.2 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 41.3 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 49.4, 50.2 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.7 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 119.8 (C_2 , C_6), 123.8 (C_4), 128.8 (C_3 , C_5), 138.6 (C_1), 170.7, 170.8 (2CO).

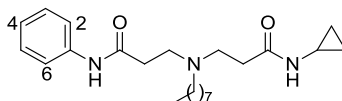
MS (ESI) : 390.2 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS , t_r (min): 9.13.

HRMS (ESI): Calculada para $C_{23}H_{39}N_3O_2$ [(M)⁺]: 389.3037. Encontrada: 389.3039.

***N*³-[3-(Ciclopropilamino)-3-oxopropil]-*N*¹-fenil-*N*³-octil-β-alaninamida (18)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **24** (82 mg, 0.7 mmol), la amina **15** (136 mg, 0.5 mmol) y DBU (110 μL, 0.7 mmol) como un aceite (43 mg) con un rendimiento del 22%.



Cromatografía: acetato de etilo.

Rf: 0.28 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm⁻¹): 3317, 3307 (NH), 1651, 1547 (CON), 1600, 1499, 1444 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.36-0.41 (m, 2H, 2x½CH₂ciclo), 0.64 (m, 2H, 2x½CH₂ciclo), 0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.22-1.25 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.50 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.34 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂CO), 2.49 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, (CH₂)₆CH₂N), 2.52 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂CO), 2.56-2.61 (m, 1H, CH_{ciclo}), 2.80 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, COCH₂CH₂N), 2.83 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, COCH₂CH₂N), 6.57 (s a, 1H, NH), 7.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₄), 7.28 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.55 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₂, H₆), 9.68 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 6.5 (2CH₂ciclo), 14.2 (CH₃), 22.7 (CH_{ciclo}), 22.8, 26.8, 27.7, 29.4, 29.6, 31.9 ((CH₂)₆CH₃), 33.4, 34.3 (2CH₂CO), 49.5, 50.2 (2CH₂N), 53.8 ((CH₂)₆CH₂N), 119.9 (C₂, C₆), 124.0 (C₄), 129.0 (C₃, C₅), 138.5 (C₁), 170.8, 173.3 (2CO).

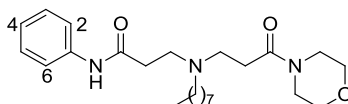
MS (ESI): 387.8 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.97.

HRMS (ESI): Calculada para $C_{23}H_{38}N_3O_2$ [(M+H)⁺]: 388.2958. Encontrada: 388.2942.

***N*¹-Fenil-*N*³-(3-morfolin-4-il-3-oxopropil)-*N*³-octil-β-alaninamida (19)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **25** (77 mg, 0.5 mmol), la amina **15** (100 mg, 0.4 mmol) y DBU (81 μL, 0.5 mmol) como un aceite (100 mg) con un rendimiento del 60%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.13 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3412, 3295 (NH), 1709, 1636, 1547 (CON), 1600, 1499, 1441 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , δ): 0.85 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.20-1.24 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.50-1.55 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.48-2.56 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{CO}$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.80 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.93 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.36 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_2\text{O}$), 3.53 (s a, 4H, $2\text{CH}_2\text{NCO}$), 3.58 (t, $J = 4.8$ Hz, 2H, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_2\text{O}$), 7.04 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_4), 7.27 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.51 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 10.24 (s a, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , δ): 14.6 (CH_3), 23.8, 27.9, 28.6, 30.5, 30.8 (5CH_2), 30.9 (CH_2CO), 33.1 (CH_2), 35.0 (CH_2CO), 43.4, 47.3 ($2\text{CH}_2\text{NCO}$), 50.6, 51.3 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 55.0 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 67.7, 67.8 ($2\text{CH}_2\text{O}$), 121.3 (C_2 , C_6), 125.2 (C_4), 129.9 (C_3 , C_5), 139.9 (C_1), 172.7, 173.1 (2CO).

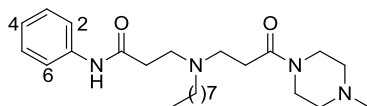
MS (ESI): 417.9 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 20.68.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_3$ [(M+H) $^+$]: 418.3064. Encontrada: 418.3046.

N^1 -Fenil- N^3 -[3-(4-metilpiperazin-1-il)-3-oxopropil]- N^3 -octil- β -alaninamida (20)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **26** (42 mg, 0.3 mmol), la amina **15** (50 mg, 0.2 mmol) y DBU (41 μL , 0.3 mmol) como un aceite (44 mg) con un rendimiento del 51%.



Cromatografía: acetato de etilo a acetato de etilo/metanol, 8:2.

Rf: 0.42 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3307 (NH), 1683, 1634, 1548 (CON), 1602, 1497, 1443 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.22-1.26 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.51-1.55 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.30 (s, 3H, CH_3N), 2.32 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.38 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.52-2.59 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{NCH}_3$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.82 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.95 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.45 (t, $J = 5.1$ Hz, 2H, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_2\text{NCO}$), 3.62 (t, $J = 5.0$ Hz, 2H, $2 \times \frac{1}{2}\text{CH}_2\text{NCO}$), 7.08 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_4), 7.32 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.56 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 10.28 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.2 (CH_3CH_2), 22.8, 26.8, 27.8, 29.4, 29.6 (5CH_2), 30.2 (CH_2CO), 31.9 (CH_2), 34.4 (CH_2CO), 41.6, 45.3 ($2\text{CH}_2\text{NCO}$), 45.9 (CH_3N), 49.0, 50.8 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 54.5, 55.0 ($2\text{CH}_2\text{NCH}_3$), 119.8 (C_2 , C_6), 123.7 (C_4), 129.0 (C_3 , C_5), 138.8 (C_1), 169.8, 171.1 (2CO).

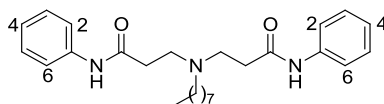
MS (ESI): 431.1 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 20.05.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_2$ [(M+H) $^+$]: 431.3380. Encontrada: 431.3383.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*¹-fenil-*N*³-octil- β -alaninamida (21)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **14** (500 mg, 3.4 mmol), octilamina (182 μL , 1.1 mmol) y DBU (508 μL , 3.4 mmol) como un aceite (387 mg) con un rendimiento del 83%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 1:1.

Rf: 0.45 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3294 (NH), 1659, 1546 (CON), 1601, 1497 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.08 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.19-1.25 (m, 8H, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.52 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.53 (t, $J = 6.3$ Hz, 6H, $2\text{CH}_2\text{CO}$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.85 (t, $J = 6.2$ Hz, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.02 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2H_4), 7.20 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H, 2H_3 , 2H_5), 7.43 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H, 2H_2 , 2H_6), 8.90 (s a, 2H, 2NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.0 (CH_3), 22.6, 26.8, 27.7, 29.3, 29.5, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 34.5 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 49.9 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.7 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 119.9 (2C_2 , 2C_6), 124.0 (2C_4), 128.9 (2C_3 , 2C_5), 138.1 (2C_1), 170.4 (2CO).

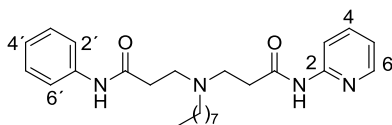
MS (ESI): 424.3 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 21.60.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_2$ [(M+H) $^+$]: 424.2958. Encontrada: 424.2958.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*³-octil-*N*¹-piridin-2-il- β -alaninamida (22)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **27** (60 mg, 0.4 mmol), la amina **15** (75 mg, 0.3 mmol) y DBU (61 μL , 0.4 mmol) como un aceite (57 mg) con un rendimiento del 45%.



Cromatografía: acetato de etilo.

Rf: 0.28 (acetato de etilo/metanol, 98:2).

IR (ATR, cm^{-1}): 3274 (NH), 1665, 1540 (CON), 1600, 1436 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.83 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.04-1.34 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.51-2.60 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$, $2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.90 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.98-7.01 (m, 2H, H_5 , H_4), 7.20 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.47 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 7.66 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H_4), 8.17-8.22 (m, 2H, H_3 , H_6), 9.89 (s a, 1H, NH), 10.55 (s a, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.6, 26.7, 27.5, 29.2, 29.5, 31.7 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 34.1, 36.3 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 50.0, 51.0 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 54.1 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 114.5 (C_3), 119.7 (C_5), 120.0 (C_2 , C_6), 123.9 (C_4), 128.8 (C_3 , C_5), 138.5 (C_1), 138.6 (C_4), 147.5 (C_6), 151.6 (C_2), 170.9, 171.0 (2CO).

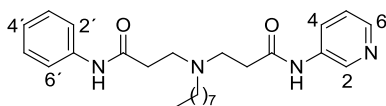
MS (ESI): 425.3 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 22.63.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_2$ [(M) $^+$]: 424.2833. Encontrada: 424.2832.

N° -(3-Anilino-3-oxopropil)- N° -octil- N' -piridin-3-il- β -alaninamida (23)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **28** (80 mg, 0.5 mmol), la amina **15** (100 mg, 0.4 mmol) y DBU (81 μL , 0.5 mmol) como un aceite (63 mg) con un rendimiento del 37%.



Cromatografía: acetato de etilo a acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.28 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3265 (NH), 1664, 1546 (CON), 1600, 1489, 1444 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.07-1.34 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.50-2.59 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$, $2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.82 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.84 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.10 (dd, $J = 8.3, 4.8$ Hz, 1H, H_5), 7.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_2 ,

H₆'), 7.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H₄), 8.21 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H, H₆), 8.54 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H₂), 9.52 (s a, 1H, NH), 9.98 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.1 (CH₃), 22.6, 26.7, 27.7, 29.3, 29.5, 31.8 ((CH₂)₆CH₃), 34.3 (2CH₂CO), 49.6, 49.8 (2CH₂N), 53.7 ((CH₂)₆CH₂N), 119.9 (C₂', C₆'), 123.7 (C₅), 124.1 (C₄'), 127.1 (C₄), 128.8 (C₃', C₅'), 135.4 (C₃), 138.0 (C₁'), 140.9 (C₂), 144.4 (C₆), 170.6, 171.4 (2CO).

MS (ESI): 425.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.14.

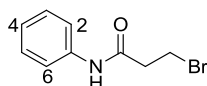
HRMS (ESI): Calculada para C₂₅H₃₆N₄O₂ [(M)⁺]: 424.2833. Encontrada: 424.2831.

4.3.7. Síntesis de los compuestos 29-35

3-Bromo-*N*-fenilpropanamida (36)

Sobre una disolución de anilina (275 µL, 3.0 mmol) en DCM anhidro (15.0 mL) se añade, gota a gota y a 0 °C, cloruro de 3-bromopropanoilo (315 µL, 3.3 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. El crudo de reacción se lava consecutivamente con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃, CuSO₄ y NaCl. Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ y el disolvente se elimina a presión reducida para dar lugar a la anilida deseada **36** como un sólido (629 mg) con un rendimiento del 92%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³¹



Rf: 0.56 (DCM/metanol, 95:5).

Pf: 118-122 °C (Lit.¹³¹ 123-124 °C).

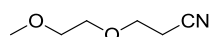
¹H-RMN (CDCl₃, δ): 2.96 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂CO), 3.65 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂Br), 7.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₄), 7.27 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H₃, H₅), 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H₂, H₆), 8.63 (s a, 1H, NH).

- Aminas **38**, **40** y **44**

3-(2-Metoxietoxi)propanonitrilo (37)

Este compuesto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento previamente descrito por Greef *et al.* y los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³²

Se agita una disolución de 2-metoxietanol (2.0 mL, 26.3 mmol) y acilonitrilo (15.0 mL, 229 mmol) a 0 °C durante 10 min. A continuación, se adiciona KOH (133 mg, 2.4 mmol) en polvo y la mezcla se agita a 0 °C durante 1.5 h. Transcurrido este tiempo, se añaden a la mezcla 4 gotas de HCl concentrado. Se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se redissuelve en cloroformo, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida para obtener el nitrilo deseado como un aceite (3.40 g) con rendimiento cuantitativo.

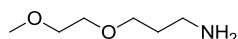


Rf: 0.28 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 2.64 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2CN), 3.40 (s, 3H, CH_3), 3.55-3.58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 3.66-3.69 (m, 2H, OCH_2), 3.73 (t, $J = 6.5$ Hz, OCH_2).

- **3-(2-Metoxietoxi)propan-1-amina (38)**

Sobre una disolución del nitrilo **37** (440 mg, 3.4 mmol) en THF anhidro (41.6 mL) se añade gota a gota una disolución de BH_3 (1 M en THF, 7.7 mL, 7.7 mmol) y la mezcla se calienta a reflujo durante 3.5 h. Transcurrido este tiempo, y tras enfriamiento de la mezcla hasta alcanzar la temperatura ambiente, se adiciona lentamente y de manera consecutiva metanol (73 mL) y HCl concentrado (8.0 mL). La mezcla se extrae con DCM, los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 y se elimina el disolvente a presión reducida para obtener la amina deseada como un aceite (403 mg) con un rendimiento del 89%.



Rf: 0.25 (hexano/acetato de etilo, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3367 (NH).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 1.74 (qt, $J = 6.5$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.78 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, CH_2N), 3.38 (s, 3H, CH_3), 3.52-3.60 (m, 6H, $3\text{CH}_2\text{O}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 33.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 39.4 (CH_2N), 59.1 (CH_3), 69.6, 70.1, 72.0 ($3\text{CH}_2\text{O}$).

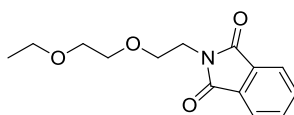
MS (ESI): 134.1 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 3.04.

- **2-[2-(2-Etoxietoxi)etil]-1H-isoindol-1,3(2H)-diona (39)**

Este compuesto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento previamente descrito por Jadhav *et al.* y los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³³

Sobre una disolución de 2-(2-etoxietoxi)etanol (505 μL , 3.7 mmol), ftalimida (549 mg, 3.7 mmol) y trifenilfosfina (977 mg, 3.7 mmol) en tolueno anhidro (11.2 mL) se añade, a 0 $^{\circ}\text{C}$, azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD, 792 μL , 4.0 mmol). La mezcla de reacción se agita durante 50 min a 0 $^{\circ}\text{C}$ y 1 h más a temperatura ambiente. A continuación, se adiciona metanol anhidro (2.9 mL) y se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, el disolvente se elimina a presión reducida y el precipitado formado se filtra y se lava con metanol. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo obtenido se filtra, lavando con hexano. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (hexano a hexano/acetato de etilo, 7:3) para obtener el producto deseado como un aceite (565 mg) con un rendimiento del 58%.



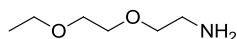
Rf: 0.22 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1.13 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3), 3.45 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 3.53 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2N), 3.52-3.55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.62-3.65 (m, 2H, CH_2O), 3.74 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.90 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 7.70 (m, 2H, 2H_3), 7.84 (m, 2H, 2H_2).

2-(2-Etoxietoxi)etanamina (40)

Este compuesto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento previamente descrito por Jadhav *et al.* y los datos espectroscópicos corresponden con los previamente descritos.¹³³

Sobre una disolución del derivado **39** (295 mg, 1.1 mmol) en metanol anhidro (4.9 mL) se adiciona hidracina (109 μL , 2.2 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, se añade NaBH_4 (42 mg, 1.1 mmol) y una segunda porción de hidracina (109 μL , 2.2 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se filtra la suspensión formada y se elimina el disolvente del filtrado a presión reducida. El residuo obtenido se redissuelve en acetato de etilo, se calienta a 50 $^{\circ}\text{C}$, se trata con ultrasonidos y se filtra. Se elimina el disolvente del filtrado a presión reducida para obtener la amina deseada como un aceite (104 mg) con un rendimiento del 71%.



Rf: 0.35 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

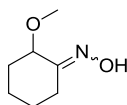
IR (ATR, cm^{-1}): 3054 (NH).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 1.20 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.95 (s a, 2H, NH_2), 2.85 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, CH_2N), 3.42-3.53 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{O}$), 3.56-3.62 (m, 4H, $2\text{CH}_2\text{O}$).

N-Hidroxi-2-metoxiciclohexanimina (41)

Este compuesto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento previamente descrito por Hutchins *et al.* y los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³⁴

Sobre una disolución de acetato de sodio (192 mg, 2.3 mmol) y clorhidrato de hidroxilamina (163 mg, 2.3 mmol) en agua (5.8 mL) previamente calentada a 60 °C, se añade una disolución de 2-metoxiciclohexanona (147 μL , 1.1 mmol) en metanol (0.6 mL). Se adiciona metanol hasta completa disolución y la mezcla de reacción se agita a 60 °C durante toda la noche. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se adiciona sobre la mezcla agua (5.5 mL) y se extrae con éter dietílico. El extracto orgánico se lava consecutivamente con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl , se seca sobre Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 7:3) para obtener el compuesto de interés como un aceite (157 mg) con rendimiento cuantitativo.

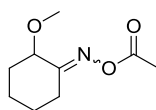


Rf: 0.40 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 1.35-1.94 (m, 5H, 2CH_2 , $\frac{1}{2}\text{CH}_2$), 2.03-2.14 (m, 2H, CH_2), 3.01-3.05 (m, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2$), 3.27 (s, 3H, CH_3), 3.75 (m, 1H, CH), 6.05 (s a, 1H, OH).

1-[[2-Metoxiciclohexilideno]amino]oxi]etanona (42)

Una disolución de la oxima **41** (166 mg, 1.2 mmol), piridina (337 μL , 4.2 mmol) y anhídrido acético (680 μL , 7.2 mmol) se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y se coevapora de nuevo con tolueno. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 7:3) para obtener el producto de interés como un aceite (189 mg) con un rendimiento del 85%.



Rf: 0.42 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

IR (ATR, cm^{-1}): 1769 (COO), 1702 (CN), 1193 (COC).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1.34-1.70 (m, 5H, 2CH_2 , $\frac{1}{2}\text{CH}_2$), 1.73-2.02 (m, 2H, CH_2), 2.07-2.26 (m, 5H, CH_2 , CH_3CO), 3.03-3.08 (m, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2$), 3.30 (s, 3H, OCH_3), 3.95 (m, 1H, CH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 19.3 (CH_3CO diastereoisómero), 19.4 (CH_2 diastereoisómero), 19.4 (CH_3CO diastereoisómero), 19.6, 23.2, 25.5, 26.8, 28.0, 31.8, 32.7 (3CH_2 diastereoisómeros Z/E), 56.0, 56.2 (CH_3O diastereoisómeros Z/E), 70.1, 77.0 (CH diastereoisómeros Z/E), 166.9, 167.4, 168.3, 168.5 (CN, CO diastereoisómeros Z/E).

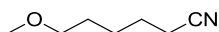
MS (ESI): 125.9 [(M- OCOCH_3) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 6.56.

6-Metoxihexanonitrilo (43)

Este compuesto se ha sintetizado siguiendo el procedimiento previamente descrito por Fujioka *et al.*¹³⁵

Una disolución del derivado **42** (120 mg, 0.7 mmol), trimetilsilano (124 μL , 0.8 mmol) y cantidades catalíticas de trifluorosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf, 12 μL , 70.0 nmol) se agita a 0 $^\circ\text{C}$ durante 6 h. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 8:2) para obtener el nitrilo de interés como un aceite (77 mg) con un rendimiento del 87%.



Rf: 0.33 (hexano/acetato de etilo, 8:2).

IR (ATR, cm^{-1}): 2246 (CN), 1120 (COC).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1.47-1.75 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{CN}$), 2.36 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2CN), 3.34 (s, 3H, CH_3), 3.39 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2O).

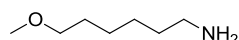
^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 17.3, 25.4, 25.6, 29.0 ($(\text{CH}_2)_4\text{CN}$), 58.8 (CH_3), 72.3 (CH_2O), 119.8 (CN).

MS (ESI): 113.0 [(M- CH_3 +H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 6.63.

6-Metoxihexan-1-amina (44)

Sobre una disolución del nitrilo **45** (100 mg, 0.8 mmol) en THF anhidro (1.0 mL), se adiciona una disolución de BH_3 (1 M en THF, 3.2 mL, 3.2 mmol) y la mezcla se agita a reflujo durante 3.5 h. Transcurrido este tiempo, se adicionan lentamente y de forma consecutiva metanol (1.8 mL) y HCl concentrado (0.2 mL). La mezcla se extrae con DCM, el extracto orgánico se seca sobre Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (acetato de etilo/metanol, 9:1) para obtener la amina deseada como un aceite (70 mg) con un rendimiento del 67%.



Rf: 0.13 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3332 (NH).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1.34-1.49 (m, 4H, 2CH_2), 1.56 (qt, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2), 1.79 (qt, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 2.99 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2N), 3.32 (s, 3H, CH_3), 3.37 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2O).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 25.7, 26.4, 27.6, 29.4 ($(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{N}$), 40.0 (CH_2N), 58.6 (CH_3), 72.6 (CH_2O).

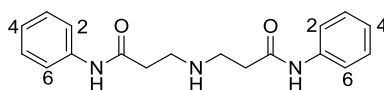
MS (ESI): 132.0 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 2.99.

- **Compuestos finales 29-35**

N^3 -(3-Anilino-3-oxopropil)- N^1 -fenil- β -alaninamida (29)

A una disolución del bromoderivado **36** (500 mg, 2.2 mmol) en DCM anhidro (4.0 mL), se añade una disolución de amoníaco (2 M en metanol, 1.1 mL, 2.2 mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se redissuelve en DCM. El crudo de reacción se lava con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO_3 y NaCl , consecutivamente. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna (acetato de etilo/metanol, 95:5), obteniéndose el compuesto **29** como un aceite (103 mg) con un rendimiento del 15%.



Rf: 0.18 (DCM/metanol, 95:5).

IR (ATR, cm^{-1}): 3285 (NH), 1733 (CO), 1668, 1602 (Ar).

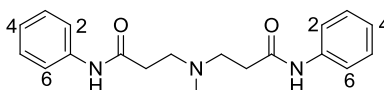
$^1\text{H-RMN}$ (CD_3OD , δ): 2.59 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H, $2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.89 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H, $2\text{CH}_2\text{N}$), 6.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2H_4), 7.10 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H, 2H_3 , 2H_5), 7.37 (d, $J = 7.7$ Hz, 4H, 2H_2 , 2H_6).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CD_3OD , δ): 35.6 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 50.9 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 121.5 (2C_2 , 2C_6), 125.0 (2C_4), 129.7 (2C_3 , 2C_5), 139.5 (2C_1), 173.3 (2CO).

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2$ [(M+H) $^+$]: 312.1706. Encontrada: 312.1706.

N^3 -(3-Anilino-3-oxopropil)- N^1 -fenil- N^3 -metil- β -alaninamida (30)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **14** (500 mg, 3.4 mmol), metilamina (2 M en THF, 1.1 mmol) y DBU (508 μL , 3.4 mmol) como un aceite (340 mg) con un rendimiento del 95%.



Cromatografía: DCM/metanol, 95:5.

Rf: 0.13 (DCM/metanol, 95:5).

IR (ATR, cm^{-1}): 3298 (NH), 1660, 1547 (CO), 1600, 1497, 1443 (Ar).

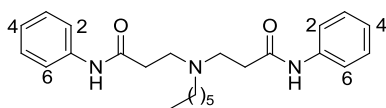
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.52 (t, $J = 5.9$ Hz, 4H, $2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.75 (t, $J = 5.9$ Hz, 4H, $2\text{CH}_2\text{N}$), 7.01 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, 2H_4), 7.17 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, 2H_3 , 2H_5), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H, 2H_2 , 2H_6), 9.36 (s a, 2H, 2NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 34.3 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 41.3 (CH_3N), 53.0 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 120.1 (2C_2 , 2C_6), 124.0 (2C_4), 128.8 (2C_3 , 2C_5), 138.2 (2C_1), 170.5 (2CO).

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2$ [(M+H) $^+$]: 326.1863. Encontrada: 326.1866.

N^3 -(3-Anilino-3-oxopropil)- N^1 -fenil- N^3 -hexil- β -alaninamida (31)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **14** (500 mg, 3.4 mmol), hexilamina (145 μL , 1.1 mmol) y DBU (508 μL , 3.4 mmol) como un aceite (331 mg) con un rendimiento del 76%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.21 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3298 (NH), 1660, 1547 (CO), 1601, 1498, 1443 (Ar).

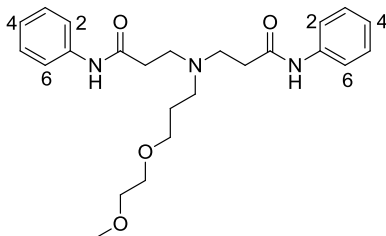
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.82 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.20-1.28 (m, 6H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 1.50-54 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 2.52 (t, $J = 6.2$ Hz, 6H, $2\text{CH}_2\text{CO}$, $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{N}$), 2.83 (t, $J = 6.2$ Hz, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.02 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2H_4), 7.19 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H, 2H_3 , 2H_5), 7.44 (d, $J = 7.9$ Hz, 4H, 2H_2 , 2H_6), 9.08 (s a, 2H, 2NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.4 (CH_3), 23.0, 27.1, 27.7, 32.1 ($(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), 34.7 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 50.1 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 54.0 ($(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{N}$), 120.2 (2C_2 , 2C_6), 124.4 (2C_4), 129.3 (2C_3 , 2C_5), 138.5 (2C_4), 170.9 (2CO).

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2$ [(M+H) $^+$]: 396.2646. Encontrada: 369.2648.

N^3 -(3-Anilino-3-oxopropil)- N^1 -fenil- N^3 -[3-(2-metoxietoxi)propil]- β -alaninamida (32)

Obtenida, utilizando el procedimiento 4.3.1.5., a partir de la acrilamida **14** (332 mg, 2.3 mmol), la amina **38** (100 mg, 0.8 mmol) y DBU (112 μL , 0.8 mmol) como un aceite (133 mg) con un rendimiento del 39%.



Cromatografía: acetato de etilo a acetato de etilo/metanol, 8:2.

Rf: 0.29 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3305 (NH), 1662, 1545 (CON), 1600, 1497, 1443 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 1.59 (qt, $J = 5.7$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.51 (t ap, $J = 6.0$ Hz, 4H, $2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.54 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.75 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.28 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.39-3.42 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.45 (s, 3H, CH_3), 3.60-3.63 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 6.98 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2H_4), 7.11 (t, $J = 7.7$ Hz, 4H, 2H_3 , 2H_5), 7.39 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H, 2H_2 , 2H_6), 8.89 (s a, 2H, 2NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 27.1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 35.5 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 49.3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 50.6 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 58.9 (CH_3), 67.2, 69.4, 72.5 ($3\text{CH}_2\text{O}$), 119.8 (2C_2 , 2C_6), 123.6 (2C_4), 128.7 (2C_3 , 2C_5), 138.4 (2C_1), 171.9 (2CO).

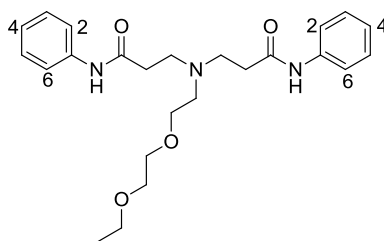
MS (ESI): 427.9 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 19.03.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$ [(M+H)⁺]: 428.2549. Encontrada: 428.2542.

N^3 -(3-Anilino-3-oxopropil)- N^3 -[2-(2-etoxietoxi)etil]- N^1 -fenil- β -alaninamida (33)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **14** (332 mg, 2.3 mmol), la amina **40** (100 mg, 0.8 mmol) y DBU (112 μL , 0.8 mmol) como un aceite (181 mg) con un rendimiento del 53%.



Cromatografía: acetato de etilo a acetato de etilo/metanol, 8:2.

R_f: 0.30 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3303 (NH), 1660, 1547 (COO), 1601, 1496, 1443 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 1.14 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3), 2.53 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, $2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.74 (t, $J = 4.9$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.87 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.44-3.49 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, OCH_2CH_3), 3.54-3.59 (m, 4H, $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 6.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2H_4), 7.13 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H, 2H_3 , 2H_5), 7.43 (d, $J = 7.7$ Hz, 4H, 2H_2 , 2H_6), 9.24 (s a, 2H, 2NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 15.0 (CH_3), 35.2 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 51.4 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 54.7 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 66.6, 69.3, 69.6, 70.3 ($4\text{CH}_2\text{O}$), 120.0 (2C_2 , 2C_6), 123.8 (2C_4), 128.7 (2C_3 , 2C_5), 138.3 (2C_1), 171.0 (2CO).

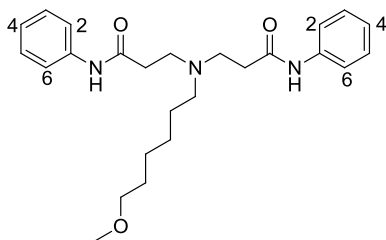
MS (ESI): 427.9 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 20.26.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ [(M+Na)⁺]: 450.2368. Encontrada: 450.2366.

***N*³-[3-(Anilino)-3-oxopropil]-*N*¹-fenil-*N*³-[6-(metoxihexil)]-β-alaninamida (34)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **14** (168 mg, 1.1 mmol), la amina **44** (60 mg, 0.5 mmol) y DBU (171 μL, 1.1 mmol) como un aceite (45 mg) con un rendimiento del 21%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

R_f: 0.42 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm⁻¹): 3238 (NH), 1678, 1645, 1548 (CON), 1601, 1495, 1443 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 1.24-1.34 (m, 4H, 2CH₂), 1.42-1.56 (m, 4H, 2CH₂), 2.51 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, (CH₂)₅CH₂N), 2.53 (t, *J* = 5.9 Hz, 4H, 2CH₂CO), 2.83 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, 2COCH₂CH₂N), 3.29-3.33 (m, 5H, CH₂OCH₃), 7.02 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2H₄), 7.18 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H, 2H₃, 2H₅), 7.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, 2H₂, 2H₆), 9.20 (s a, 2H, 2NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 25.9, 26.6, 27.2, 29.5 (OCH₂(CH₂)₄), 34.6 (2CH₂CO), 50.0 (2CH₂N), 53.4 ((CH₂)₅CH₂N), 58.6 (CH₃), 72.8 (OCH₂), 119.9 (2C₂, 2C₆), 124.0 (2C₄), 128.9 (2C₃, 2C₅), 138.3 (2C₁), 170.7 (2CO).

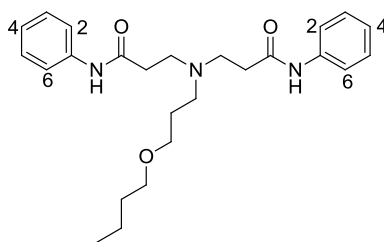
MS (ESI): 425.7 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.40.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₅H₃₄N₃O₃ [(M-H)⁻]: 424.2600. Encontrada: 424.2610.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*³-(3-butoxypropil)-*N*¹-fenil-β-alaninamida (35)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **14** (336 mg, 2.3 mmol), 3-butoxiopropilamina (100 mg, 0.8 mmol) y DBU (228 μL, 1.6 mmol) como un aceite (85 mg) con un rendimiento del 25%.



Cromatografía: acetato de etilo.

Rf: 0.30 (acetato de etilo).

IR (ATR, cm^{-1}): 3287 (NH), 1661, 1547 (CON), 1600, 1498, 1443 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.76 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.10-1.37 (m, 4H, $(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1.64 (qt, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 2.44-2.52 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{CO}$, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 2.75 (t, $J = 6.3$ Hz, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.13 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, CH_2O), 3.30 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2O), 6.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2H_4), 7.10 (t, $J = 7.9$ Hz, 4H, 2H_3 , 2H_5), 7.37 (dd, $J = 8.8$, 1.0 Hz, 4H, 2H_2 , 2H_6).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.4 (CH_3), 20.4 (CH_2CH_3), 28.3, 32.9 ($2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 35.6 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 51.2 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 51.3 ($\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{O}$), 69.8, 71.7 ($2\text{CH}_2\text{O}$), 121.3 (2C_2 , 2C_6), 125.1 (2C_4), 129.8 (2C_3 , 2C_5), 139.7 (2C_1), 173.4 (2CO).

MS (ESI): 425.9 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 16.31.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ [(M+Na) $^+$]: 448.2576. Encontrada: 448.2564.

4.3.8. Síntesis de los compuestos 45-56

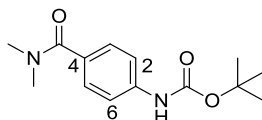
- **Acrilamidas 59-69**

4-[(Dimetilamino)carbonil]fenilcarbamato de *tert*-butilo (57)

Sobre una disolución de ácido 4-(Boc-amino)benzoico (459 mg, 1.4 mmol), clorhidrato de dimetilamina (269 mg, 3.3 mmol) y tetrafluoroborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (TBTU, 459 mg, 1.4 mmol) en DMF anhidra (1.3 mL), se añade trietilamina (0.9 mL, 6.6 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. A continuación, sobre el crudo de reacción se adiciona agua y se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato

de etilo, 3:7) para obtener el compuesto deseado **57** (277 mg) como un aceite con un rendimiento del 75%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³⁶



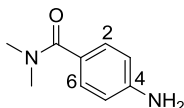
R_f: 0.56 (acetato de etilo).

¹H-RMN (CD₃OD, δ): Mezcla de rotámeros A:B, 1:1; 1.52 (s, 9H, 3CH₃C), 3.05, 3.07 (2 s a, 6H, 2CH₃N, rotámeros A y B), 7.35 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.49 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₂, H₆).

4-Amino-*N,N*-dimetilbenzamida (**58**)

Una disolución del compuesto **57** (216 mg, 0.8 mmol) en una mezcla de ácido trifluoroacético/DCM 1:1 (8.7 mL) se agita durante 1 h a temperatura ambiente. Tras este tiempo, el crudo de reacción se lava con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃ y NaCl, consecutivamente. Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (acetato de etilo) para obtener el derivado **58** como un sólido (122 mg) con un rendimiento del 93%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³⁷



R_f: 0.35 (acetato de etilo).

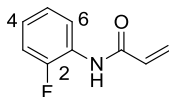
Pf: 147-148 °C. (Lit.¹³⁸ 151-154 °C).

¹H-RMN (CD₃OD, δ): 3.06 (s, 6H, 2CH₃N), 6.69 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₂, H₆).

N-(2-Fluorofenil)acrilamida (**59**)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (500 μL, 5.8 mmol), piridina (471 μL, 5.8 mmol) y 2-fluoroanilina (500 μL, 5.2 mmol) como un sólido (747 mg) con un rendimiento del 87%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹³⁹



Rf: 0.53 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

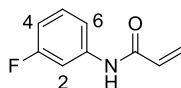
Pf: 102-103 °C.

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 5.80 (dd, *J* = 10.0, 1.4 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.30 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H, CH=), 6.45 (dd, *J* = 16.9, 1.4 Hz, 1H, ½CH₂=), 7.02-7.17 (m, 3H, H₃, H₄, H₆), 7.54 (s a, 1H, NH), 8.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₅).

N-(3-Fluorofenil)acrilamida (60)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (500 µL, 5.8 mmol), piridina (471 µL, 5.8 mmol) y 3-fluoroanilina (500 µL, 5.2 mmol) como un sólido (601 mg) con rendimiento del 70%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹⁴⁰



Rf: 0.51 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

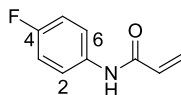
Pf: 119-120 °C. (Lit.¹⁴⁰ 125-126 °C).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 5.79 (dd, *J* = 10.1, 1.3 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.27 (dd, *J* = 16.9, 10.1 Hz, 1H, CH=), 6.45 (dd, *J* = 16.8, 1.3 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.79-6.86 (m, 1H, H₄), 7.20-7.30 (m, 2H, H₅, H₆), 7.57 (s a, 1H, H₂), 7.70 (s a, 1H, NH).

N-(4-Fluorofenil)acrilamida (61)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (180 µL, 2.2 mmol), piridina (68 µL, 2.2 mmol) y 4-fluoroanilina (220 µL, 2.0 mmol) como un sólido (116 mg) con rendimiento del 35%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹⁴¹



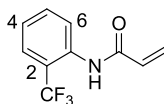
Rf: 0.41 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

Pf: 152-153 °C. (Lit.¹⁴² 148-150 °C)

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 5.80 (dd, *J* = 10.2, 1.3 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.24 (dd, *J* = 16.8, 10.2 Hz, 1H, CH=), 6.46 (dd, *J* = 16.8, 1.3 Hz, 1H, ½CH₂=), 7.05 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.24 (s a, 1H, NH), 7.53-7.58 (m, 2H, H₂, H₆).

N-[2-(Trifluorometil)fenil]acrilamida (62)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (350 µL, 4.3 mmol), piridina (349 µL, 4.3 mmol) y 2-(trifluorometil)anilina (500 µL, 3.9 mmol) como un sólido (520 mg) con un rendimiento del 62%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3.

Rf: 0.39 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

Pf: 115-116 °C.

IR (ATR, cm⁻¹): 3275 (NH), 1664 (CON), 1634, 1613, 1591, 1534 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 5.82 (dd, *J* = 10.1, 1.2 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.29 (dd, *J* = 16.9, 10.0 Hz, 1H, CH=), 6.44 (dd, *J* = 16.9 Hz, 1.2 Hz, 1H, ½CH₂=), 7.25 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H₃), 7.56 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₄), 7.61 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₅), 7.67 (s a, 1H, NH), 8.24 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₆).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 120.3 (q, *J* = 28.9 Hz, C₂), 124.2 (q, *J* = 273.2 Hz, CF₃), 124.5, 124.8 (C₄, C₅), 126.2 (q, *J* = 5.4 Hz, C₃), 128.6 (CH₂=), 131.1, 133.1 (C₆, CH=), 135.2 (C₁), 163.7 (CO).

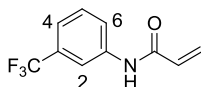
¹⁹F-NMR (CDCl₃, δ): 60.8.

MS (ESI): 216.0 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 7.86.

N-[3-(Trifluorometil)fenil]acrilamida (63)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (350 µL, 4.3 mmol), piridina (349 µL, 4.3 mmol) y 3-(trifluorometil)anilina (500 µL, 3.9 mmol) como un sólido (705 mg) con un rendimiento del 84%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3.

Rf: 0.38 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

Pf: 85-86 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3285 (NH), 1671 (CON), 1608, 1557, 1492, 1447 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 5.82 (dd, $J = 10.1, 1.2$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.26 (dd, $J = 16.8, 10.2$ Hz, 1H, CH=), 6.48 (dd, $J = 16.8$ Hz, 1.2 Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 7.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H₄), 7.45 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H₅), 7.51 (s a, 1H, NH), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H₆), 7.88 (s, 1H, H₂).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 116.9, 121.2, 123.3 (C₄, C₅, C₆), 123.9 (q, $J = 272.5$ Hz, CF₃), 128.9 (CH₂=), 129.7, 130.8 (C₂, CH=), 131.5 (q, $J = 32.6$ Hz, C₃), 138.3 (C₁), 164.0 (CO).

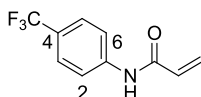
^{19}F -NMR (CDCl_3 , δ): 63.1.

MS (ESI): 215.9 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.02.

N-[4-(Trifluorometil)fenil]acrilamida (64)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (210 μL , 2.6 mmol), piridina (211 μL , 2.6 mmol) y 3-(trifluorometil)anilina (300 μL , 2.4 mmol) como un sólido (331 mg) con un rendimiento del 64%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3.

Rf: 0.33 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

Pf: 171-172 °C.

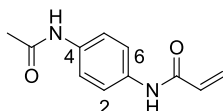
^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 5.84 (dd, $J = 10.2, 1.2$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.25 (dd, $J = 16.8, 10.2$ Hz, 1H, CH=), 6.48 (dd, $J = 16.8, 1.1$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 7.35 (s a, 1H, NH), 7.60 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H₃, H₅), 7.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H₂, H₆).

MS (ESI): 216.1 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.49.

***N*-[4-(Acetilamino)fenil]acrilamida (65)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (267 μ L, 3.3 mmol), piridina (268 μ L, 3.3 mmol) y *N*-(4-aminofenil)acetamida (612 mg, 3.0 mmol) como un sólido (251 mg) con un rendimiento del 41%.



Rf: 0.18 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

Pf: >220 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3277 (NH), 1665 (CON), 1616, 1583, 1517 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 2.02, (s, 3H, CH_3), 5.73 (dd, $J = 10.0, 2.2$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.23 (dd, $J = 17.0, 2.2$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.42 (dd, $J = 17.0, 10.0$ Hz, 1H, CH=), 7.51 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, $\text{H}_2, \text{H}_6 / \text{H}_3, \text{H}_5$), 7.58 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, $\text{H}_2, \text{H}_6 / \text{H}_3, \text{H}_5$), 9.90 (s a, 1H, NH), 10.08 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 23.9 (CH_3), 119.3 ($\text{C}_2, \text{C}_6 / \text{C}_3, \text{C}_5$), 119.7 ($\text{C}_2, \text{C}_6 / \text{C}_3, \text{C}_5$), 126.5 ($\text{CH}_2=$), 131.9 (CH=), 134.2, 135.1 (C_1, C_4), 162.8, 168.0 (2CO).

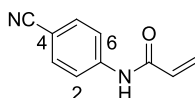
MS (ESI): 204.8 [(M) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 15.99.

***N*-[4-(Ciano)fenil]acrilamida (66)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (410 μ L, 5.0 mmol), piridina (406 μ L, 5.0 mmol) y 4-aminobenzonitrilo (550 mg, 4.6 mmol) como un sólido (539 mg) con un rendimiento del 68%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹⁴³



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3.

Rf: 0.18 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

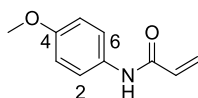
Pf: 197-199 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 5.87 (dd, $J = 10.2, 1.0$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.26 (dd, $J = 16.8, 10.2$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 6.50 (dd, $J = 16.8, 1.0$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 7.44 (s a, 1H, NH), 7.63 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_3, H_5), 7.73 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_2, H_6).

***N*-(4-Metoxifenil)acrilamida (67)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (490 μL , 6.0 mmol), piridina (487 μL , 6.0 mmol) y 4-metoxianilina (680 mg, 5.5 mmol) como un sólido (702 mg) con un rendimiento del 72%.

Los datos espectroscópicos coinciden con los previamente descritos.¹²⁸



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3.

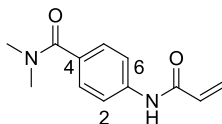
Rf: 0.27 (hexano/acetato de etilo, 6:4).

Pf: 98-99 $^{\circ}\text{C}$ (Lit.¹³⁰ 97-98 $^{\circ}\text{C}$).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 3.78 (s, 3H, CH_3), 5.71 (dd, $J = 10.2, 1.4$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.24 (dd, $J = 16.8, 10.0$ Hz, 1H, CHCO), 6.40 (dd, $J = 16.8, 1.4$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.85 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_3, H_5), 7.48 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H, H_2, H_6), 7.63 (s a, 1H, NH).

4-(Acrilóilamino)-*N,N*-dimetilbenzamida (68)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (41 μL , 0.5 mmol), piridina (41 μL , 0.5 mmol) y la anilina **58** (69 mg, 0.4 mmol) como un sólido (63 mg) con un rendimiento del 72%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 4:6.

Rf: 0.23 (hexano/acetato de etilo, 6:4).

Pf: 149-151 $^{\circ}\text{C}$.

IR (ATR, cm^{-1}): 3265 (NH), 1688 (CON), 1608, 1532, 1492 (Ar).

Parte experimental

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 2.99 (s, 3H, CH_3), 3.10 (s, 3H, CH_3), 5.74 (dd, $J = 9.8, 1.8$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.32 (dd, $J = 16.9, 9.8$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 6.44 (dd, $J = 16.9, 1.8$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 7.29 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_3, H_5), 7.52 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_2, H_6), 8.45 (s a, 1H, NH).

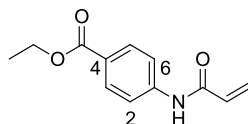
$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 35.7, 39.9 (2 CH_3), 120.0 (C_2, C_6), 128.1 ($\text{C}_3, \text{C}_5, \text{CH}_2=$), 131.2 ($\text{CH}=\text{}$), 131.7 (C_4), 139.5 (C_1), 164.1, 171.6 (2CO).

MS (ESI): 219.1 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 7.06.

4-Acrilamidobenzoato de etilo (69)

Obtenido usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (290 μL , 3.6 mmol), piridina (295 μL , 3.6 mmol) y 4-aminobenzoato de etilo (550 mg, 3.3 mmol) como un sólido (622 mg) con un rendimiento del 86%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 8:2.

R_f: 0.31 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

Pf: 119-121 $^\circ\text{C}$.

IR (ATR, cm^{-1}): 3312 (NH), 1716, 1674 (CON), 1603, 1541, 1474 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 1.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3), 4.35 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2O), 5.79 (dd, $J = 10.0, 1.4$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 6.31 (dd, $J = 16.8, 10.0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{}$), 6.46 (dd, $J = 16.8, 1.4$ Hz, 1H, $\frac{1}{2}\text{CH}_2=$), 7.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_2, H_6), 8.00 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_3, H_5), 8.07 (s a, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.5 (CH_3), 61.1 (OCH_2), 119.2 (C_2, C_6), 126.2 (C_4), 128.8 ($\text{CH}_2=$), 130.9 (C_3, C_5), 131.0 ($\text{CH}=\text{}$), 142.1 (C_1), 164.0, 166.4 (2CO).

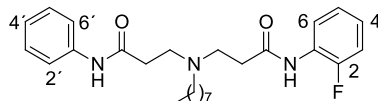
MS (ESI): 220.0 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 12.39.

- **Compuestos finales 45-56**

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*¹-(2-fluorofenil)-*N*³-octil-β-alaninamida (45)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **59** (81 mg, 0.3 mmol), la amina **15** (54 mg, 0.2 mmol) y DBU (49 μL, 0.3 mmol) como un aceite (75 mg) con un rendimiento del 85%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 95:5.

R_f: 0.38 (hexano/acetato de etilo, 3:7).

IR (ATR, cm⁻¹): 3287 (NH), 1663 (CON), 1600, 1543, 1497, 1449 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.19-1.25 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.53 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.52-2.59 (m, 6H, 2CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.83-2.92 (m, 4H, 2COCH₂CH₂N), 6.95-7.07 (m, 4H, H₃, H₄, H₆, H₄'), 7.18 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H₃', H₅'), 7.43 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₂', H₆'), 8.25 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₅), 8.80 (s a, 1H, NH), 9.61 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃), 22.7, 26.5, 27.7, 29.4, 29.6, 31.9 (6CH₂), 34.3, 34.7 (2CH₂CO), 49.7, 49.8 (2CH₂N), 53.7 ((CH₂)₆CH₂N), 114.9 (d, *J* = 19.3 Hz, C₅), 119.8 (C₂', C₆'), 122.1, 124.1 (C₆, C₄'), 124.3 (d, *J* = 34.5 Hz, C₃), 124.4 (d, *J* = 30.5 Hz, C₄), 126.6 (d, *J* = 10.4 Hz, C₁'), 128.9 (C₃', C₅'), 138.1 (C₁'), 152.6 (d, *J* = 243.0 Hz, C₂), 170.3, 171.7 (2CO).

¹⁹F-RMN (CDCl₃, δ): -130.4.

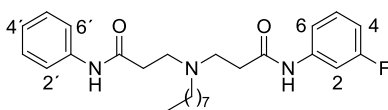
MS (ESI): 442.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.78.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₆H₃₆FN₃O₂Na [(M+Na)⁺]: 464.2689. Encontrada: 464.2718.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*¹-(3-fluorofenil)-*N*³-octil-β-alaninamida (46)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **60** (72 mg, 0.4 mmol), la amina **15** (73 mg, 0.3 mmol) y DBU (65 μL, 0.4 mmol) como un aceite (117 mg) con un rendimiento del 88%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 8:2.

Rf: 0.50 (acetato de etilo/metanol, 95:5).

IR (ATR, cm^{-1}): 1685 (CON), 1604, 1543, 1492, 1443 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.83 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.16-1.27 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.49 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.47-2.51 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{CO}$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.77-2.81 (m, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.65-6.72 (m, 1H, H_4), 6.99-7.06 (m, 3H, H_5 , H_6 , $\text{H}_{4'}$), 7.17 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7.41-7.47 (m, 3H, H_2 , $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 9.32 (s a, 1H, NH), 9.65 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.7, 26.8, 27.7, 29.4, 29.6, 31.9 (6CH_2), 34.2, 34.4 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 49.6, 49.9 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.6 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 107.3 (d, $J = 26.2$ Hz, C_4), 110.6 (d, $J = 21.3$ Hz, C_2), 115.2 (d, $J = 2.6$ Hz, C_6), 120.1 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$), 124.2 ($\text{C}_{4'}$), 128.9 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 129.9 (d, $J = 9.4$ Hz, C_5), 138.0 ($\text{C}_{1'}$), 139.8 (d, $J = 10.8$ Hz, C_1), 162.9 (d, $J = 244.1$ Hz, C_3), 170.7, 171.0 (2CO).

^{19}F -RMN (CDCl_3 , δ): -112.0.

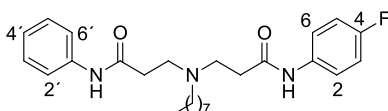
MS (ESI): 442.3 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 13.24.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{FN}_3\text{O}_2$ [(M+H) $^+$]: 442.2869. Encontrada: 442.2870.

N^3 -(3-Anilino-3-oxopropil)- N' -(4-fluorofenil)- N^o -octil- β -alaninamida (47)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **61** (50 mg, 0.2 mmol), la amina **15** (36 mg, 0.1 mmol) y DBU (35 μL , 0.2 mmol) como un sólido (26 mg) con un rendimiento del 58%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 8:2.

Rf: 0.32 (acetato de etilo).

Pf: 79-80 $^\circ\text{C}$.

IR (ATR, cm^{-1}): 3290 (NH), 1659 (CON), 1604, 1550, 1508, 1445 (Ar).

^1H -RMN (CD_3OD , δ): 0.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3), 1.08-1.41 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.52-2.61 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{CO}$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.85-2.90 (m, 4H,

2COCH₂CH₂N), 6.90 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.23 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.43-7.50 (m, 4H, H₂, H₆, H_{2'}, H_{6'}).

¹³C-RMN (CD₃OD, δ): 14.4 (CH₃), 23.7, 28.3, 28.8, 30.5, 30.8, 33.0 (6CH₂), 35.5, 37.9 (2CH₂CO), 51.0, 51.1 (2CH₂N), 54.7 ((CH₂)₆CH₂N), 116.1 (d, *J* = 22.4 Hz, C₂, C₆), 121.4 (C_{2'}, C_{6'}), 123.1 (d, *J* = 7.8 Hz, C₃, C₅), 125.1 (C_{4'}), 129.7 (C_{3'}, C_{5'}), 135.8 (d, *J* = 2.8 Hz, C₁), 139.6 (C_{4'}), 160.5 (d, *J* = 240.0 Hz, C₄), 173.2, 173.3 (2CO).

¹⁹F-RMN (CD₃OD, δ): -121.2.

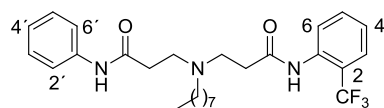
MS (ESI): 442.3 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 9.93.

Anal.: (C₂₆H₃₆FN₃O₂) C, H, N.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*³-octil-*N*¹-[2-(trifluorometil)fenil]-β-alaninamida (48)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **62** (58 mg, 0.3 mmol), la amina **15** (54 mg, 0.2 mmol) y DBU (49 μL, 0.3 mmol) como un aceite (86 mg) con un rendimiento del 89%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.35 (acetato de etilo).

IR (ATR, cm⁻¹): 3301 (NH), 1663 (CON), 1600, 1546, 1499, 1456 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.20-1.27 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.49 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.49-2.60 (m, 6H, 2CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.87-2.92 (m, 4H, 2COCH₂CH₂N), 6.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.14-7.21 (m, 3H, H₆, H_{3'}, H_{5'}), 7.38-7.47 (m, 3H, H₅, H_{2'}, H_{6'}), 7.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H₃), 7.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H₄), 8.80 (s a, 1H, NH), 9.02 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃), 22.7, 26.0, 27.7, 29.3, 29.6, 31.9 (6CH₂), 34.1, 34.2 (2CH₂CO), 49.1, 49.7 (2CH₂N), 53.3 ((CH₂)₆CH₂N), 119.8 (C_{2'}, C_{6'}), 121.2 (q, *J* = 28.3 Hz, C₂), 123.9 (C₆), 124.0 (q, *J* = 273.3 Hz, CF₃), 124.8, 125.8 (C₄, C_{4'}), 126.1 (q, *J* = 5.5 Hz, C₃), 128.9 (C_{3'}, C_{5'}), 132.8 (C₅), 135.1 (C₁), 138.2 (C_{1'}), 170.5, 170.8 (2CO).

¹⁹F-RMN (CDCl₃, δ): -60.9.

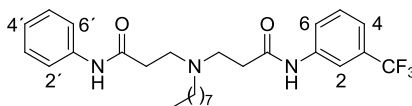
MS (ESI): 492.1 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 9.49.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₇H₃₇F₃N₃O₂Na [(M+H)⁺]: 492.2832. Encontrada: 492.2823.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*³-octil-*N*¹-[3-(trifluorometil)fenil]-β-alaninamida (49)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **63** (26 mg, 0.2 mmol), la amina **15** (34 mg, 0.1 mmol) y DBU (35 μL, 0.2 mmol) como un aceite (24 mg) con un rendimiento del 49%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.50 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm⁻¹): 3299 (NH), 1661 (CON), 1601, 1554, 1498, 1446 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.83 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.17-1.25 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.51 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.49-2.56 (m, 6H, 2CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.78-2.84 (m, 4H, 2COCH₂CH₂N), 6.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.12-7.25 (m, 4H, H₅, H₆, H_{3'}, H_{5'}), 7.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7.52 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₄), 7.87 (s, 1H, H₂), 9.22 (s a, 1H, NH), 9.70 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃), 22.7, 26.7, 27.7, 29.4, 29.6, 31.9 (6CH₂), 34.2, 34.4 (2CH₂CO), 49.6, 49.9 (2CH₂N), 53.8 ((CH₂)₆CH₂N), 116.5 (d, *J* = 3.9 Hz, C₄), 120.0 (C_{2'}, C_{6'}), 120.4 (d, *J* = 3.8 Hz, C₂), 122.9 (C₅), 124.0 (q, *J* = 272.7 Hz, CF₃), 124.3 (C_{4'}), 129.0 (C_{3'}, C_{5'}), 129.4 (C₆), 131.1 (q, *J* = 32.2 Hz, C₃), 137.9, 138.8 (C₁, C_{1'}), 170.7, 171.1 (2CO).

¹⁹F-RMN (CDCl₃, δ): -63.0.

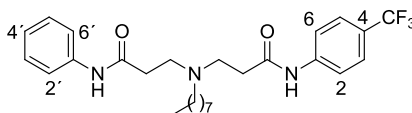
MS (ESI): 492.1 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.34.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₇H₃₇F₃N₃O₂ [(M+H)⁺]: 492.2832. Encontrada: 492.2837.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*³-octil-*N*¹-[4-(trifluorometil)fenil]-β-alaninamida (50)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **64** (110 mg, 0.5 mmol), la amina **15** (90 mg, 0.3 mmol) y DBU (88 μL, 0.5 mmol) como un sólido (147 mg) con rendimiento cuantitativo.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 8:2.

Rf: 0.58 (acetato de etilo/metanol, 8:2).

Pf: 77-78 °C.

IR (ATR, cm⁻¹): 3286 (NH), 1660 (CON), 1603, 1544, 1499, 1444 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.15-1.28 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.46-1.51 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.50-2.57 (m, 6H, 2CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.81-2.89 (m, 4H, 2COCH₂CH₂N), 7.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.20 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.38 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₂, H₆), 8.32 (s a, 1H, NH), 9.44 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.1 (CH₃), 22.7, 26.7, 27.8, 29.4, 29.6, 31.8 (6CH₂), 34.3, 34.5 (2CH₂CO), 49.6, 50.0 (2CH₂N), 53.6 ((CH₂)₆CH₂N), 119.5 (C₂, C₆), 120.1 (C_{2'}, C_{6'}), 124.2 (q, *J* = 271.5 Hz, CF₃), 124.4 (C_{4'}), 125.4 (q, *J* = 32.6 Hz, C₄), 126.0 (q, *J* = 3.9 Hz, C₃, C₅), 128.9 (C_{3'}, C_{5'}), 137.9 (C_{1'}), 141.3 (C₁), 170.7, 171.3 (2CO).

¹⁹F-RMN (CDCl₃, δ): -62.4.

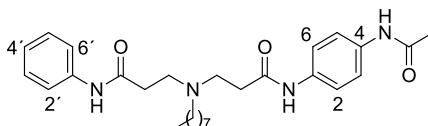
MS (ESI): 492.3 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.46.

Anal.: (C₂₇H₃₆F₃N₃O₂) C, H, N.

***N*¹-[4-(Acetilamino)fenil]-*N*³-(3-anilino-3-oxopropil)-*N*³-octil-β-alaninamida (51)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **65** (40 mg, 0.2 mmol), la amina **15** (36 mg, 0.1 mmol) y DBU (35 μL, 0.2 mmol) como un aceite (15 mg) con un 32% de rendimiento.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 8:2.

Rf: 0.33 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm⁻¹): 3291 (NH), 1664 (CON), 1600, 1550, 1515, 1499, 1444 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.13-1.28 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.51 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.12 (s, 3H, CH₃CO), 2.52-2.55 (m, 6H, 2CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.82-2.86 (m, 4H, 2COCH₂CH₂N), 7.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.19 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.26 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H₂, H₆ / H₃, H₅), 7.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H₂, H₆ / H₃, H₅), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7.74 (s a, 1H, NH), 9.32 (s a, 1H, NH), 9.37 (s a, 1H, NH).

Parte experimental

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$), 22.7 (CH_2), 24.5 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CO}$), 26.6, 27.7, 29.4, 29.6, 31.9 (5CH_2), 34.1, 34.4 ($2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 49.9 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.7 ($(\text{CH}_2)_6\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 120.0 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$), 120.7 (C_2 , C_6 / C_3 , C_5), 121.0 (C_2 , C_6 / C_3 , C_5), 124.1 ($\text{C}_{4'}$), 129.0 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 134.1, 134.6, 138.2 (C_1 , C_4 , $\text{C}_{1'}$), 168.8 (CO), 170.6 (2CO).

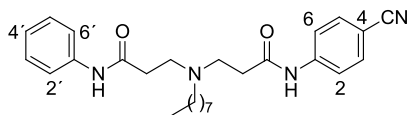
MS (ESI): 481.3 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.51.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_3\text{Na}$ [(M+Na)⁺]: 503.2998. Encontrada: 503.3000.

N^3 -(3-Anilino-3-oxopropil)- N^1 -(4-cianofenil)- N^3 -octil- β -alaninamida (52)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **66** (75 mg, 0.4 mmol), la amina **15** (75 mg, 0.3 mmol) y DBU (70 μL , 0.4 mmol) como un sólido (79 mg) con un rendimiento del 59%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 95:5.

R_f: 0.24 (acetato de etilo).

Pf: 99-100 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3294 (NH), 1664 (CON), 1597, 1531, 1500, 1444 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.83 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.14-1.25 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.47-2.57 (m, 6H, $2\text{CH}_2\text{CO}$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.77-2.85 (m, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.07 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7.20 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7.31 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.38 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 7.52 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 8.66 (s a, 1H, NH), 9.83 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.2 (CH_3), 22.7, 26.8, 27.8, 29.4, 29.6, 31.9 (6CH_2), 34.4, 34.8 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 49.4, 50.3 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.7 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 106.2 (CN), 119.2 (C_4), 119.6 (C_2 , C_6), 120.2 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$), 124.6 ($\text{C}_{4'}$), 129.1 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 133.0 (C_3 , C_5), 137.7 ($\text{C}_{1'}$), 142.5 (C_1), 170.5, 171.5 (2CO).

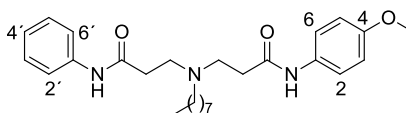
MS (ESI): 449.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 17.31.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_2\text{Na}$ [(M+Na)⁺]: 471.2733. Encontrada: 471.2733.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*¹-(4-metoxifenil)-*N*³-octil-β-alaninamida (53)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **67** (82 mg, 0.5 mmol), la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol) y DBU (88 μL, 0.4 mmol) como un aceite (86 mg) con un 63% de rendimiento.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 95:5.

R_f: 0.26 (acetato de etilo/metanol, 95:5).

IR (ATR, cm⁻¹): 3279 (NH), 1658 (CON), 1601, 1544, 1464, 1443 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.82 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.16-1.26 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.48 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.45-2.50 (m, 6H, 2CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.78 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H, 2COCH₂CH₂N), 3.71 (s, 3H, CH₃O), 6.67 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.00 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₄), 7.16 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.32 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H₂, H₆), 9.30 (s a, 1H, NH), 9.45 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.1 (CH₃), 22.7, 26.8, 27.7, 29.4, 29.6, 31.8 (6CH₂), 34.1, 34.3 (2CH₂CO), 49.8 (2CH₂N), 53.6 ((CH₂)₆CH₂N), 55.4 (CH₃O), 114.0 (C₂, C₆), 119.9 (C₂, C₆), 121.7 (C₃, C₅), 123.9 (C₄), 128.8 (C₃, C₅), 131.4 (C₁), 138.3 (C₁), 156.1 (C₄), 170.5, 170.8 (2CO).

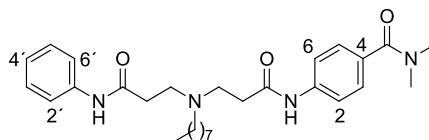
MS (ESI): 454.3 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 14.07.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₇H₄₀N₃O₃ [(M+H)⁺]: 454.3069. Encontrada: 454.3044.

***N*³-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*¹-[4-(dimetilbenzamida)fenil]-*N*³-octil-β-alaninamida (54)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **68** (33 mg, 0.2 mmol), la amina **15** (37 mg, 0.1 mmol) y DBU (44 μL, 0.2 mmol) como un aceite (28 mg) con un rendimiento del 56%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.35 (acetato de etilo/metanol/NH₃, 9:1:0.1).

IR (ATR, cm⁻¹): 3302 (NH), 1683, 1605 (CON), 1542, 1496, 1446, 1401 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.83 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.18-1.24 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.51 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.50-2.53 (m, 6H, 2CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.83 (t, *J* = 5.3 Hz, 4H, 2COCH₂CH₂N), 2.94 (s, 3H, CH₃N), 3.06 (s, 3H, CH₃N), 6.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H_{4'}), 7.17 (m, 4H, H₃, H₅, H_{3'}, H_{5'}), 7.41 (m, 4H, H₂, H₆, H_{2'}, H_{6'}), 9.39 (s a, 1H, NH), 9.70 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃CH₂), 22.7, 26.7, 27.7, 29.4, 29.6, 31.9 (6CH₂), 34.3, 34.4 (2CH₂CO), 35.6, 39.8 (2CH₃N) 49.8, 49.9 (2CH₂N), 53.6 ((CH₂)₆CH₂N), 119.4 (C₂, C₆), 120.0 (C_{2'}, C_{6'}), 124.0 (C_{4'}), 128.1 (C₃, C₅), 128.9 (C_{3'}, C_{5'}), 131.0 (C₄), 138.3, 138.8 (C₁, C_{1'}), 170.7, 171.0, 171.6 (3CO).

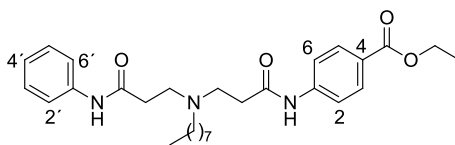
MS (ESI): 495.3 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 13.17.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₉H₄₃N₄O₃ [(M+H)⁺]: 495.3335. Encontrada: 495.3345.

4-[[*N*-(3-Anilino-3-oxopropil)-*N*-octil-β-alanil]amino]benzoato de etilo (55)

Obtenido utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **69** (226 mg, 1.0 mmol), la amina **15** (190 mg, 0.7 mmol) y DBU (220 μL, 0.2 mmol) como un aceite (291 mg) con un rendimiento del 84%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.50 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm⁻¹): 3309 (NH), 1712, 1664 (CON), 1599, 1537, 1444, 1409 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.83 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.17-1.28 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.38 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃CH₂O), 1.47-1.54 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.50-2.58 (m, 6H, 2CH₂CO, (CH₂)₆CH₂N), 2.83-2.90 (m, 4H, 2COCH₂CH₂N), 4.34 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂O), 7.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.21 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.41 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7.83 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₃, H₅), 8.47 (s a, 1H, NH), 9.39 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.1, 14.4 (2CH₃), 22.7, 26.8, 27.7, 29.3, 29.6, 31.8 (6CH₂), 34.2, 34.5 (2CH₂CO), 49.6, 49.9 (2CH₂N), 53.5 ((CH₂)₆CH₂N), 60.8 (CH₂O), 118.9 (C₂, C₆),

120.0 (C_{2'}, C_{6'}), 124.2 (C_{4'}), 125.4 (C₄), 128.9 (C_{3'}, C_{5'}), 130.6 (C₃, C₅), 138.0 (C_{1'}), 142.5 (C₁), 166.3, 170.7, 171.1 (3CO).

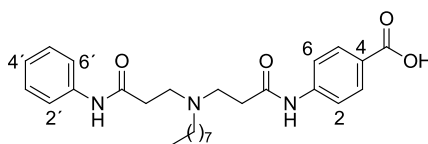
MS (ESI): 496.3 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 15.23.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₉H₄₂N₃O₄ [(M+H)⁺]: 496.3175. Encontrada: 496.3166.

Ácido 4-[[N-(3-anilino-3-oxopropil)-N-octil-β-alanil]amino]benzoico (56)

Sobre una disolución del derivado **55** (34 mg, 0.07 mmol) en THF/H₂O 2:1 (1.2 mL) se añade LiOH·H₂O (6.5 mg, 0.3 mmol) y la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 h. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se redissuelve en acetato de etilo y se lava con una disolución acuosa saturada de NaCl. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (acetato de etilo/metanol, 1:1) para obtener el ácido **56** como un aceite (9 mg) con un rendimiento del 28%.



Rf: 0.34 (acetato de etilo/metanol/NH₃, 7:3:0.2).

IR (ATR, cm⁻¹): 3275, 3193, 3057 (NH, OH), 1685 (CON), 1602, 1544, 1502, 1446 (Ar).

¹H-RMN (CD₃OD, δ): 0.86 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃), 1.25-1.29 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.67-1.72 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.52 (q, *J* = 6.3 Hz, 4H, 2CH₂CO), 3.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, (CH₂)₆CH₂N), 3.34 (m, 4H, 2COCH₂CH₂N), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.24 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.51 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 7.89 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H₃, H₅).

¹³C-RMN (CD₃OD, δ): 14.4 (CH₃), 23.7, 26.3, 28.0, 30.3, 30.4, 30.8 (6CH₂), 32.5, 32.9 (2CH₂CO), 51.1 (2CH₂N), 55.1 ((CH₂)₆CH₂N), 120.2 (C_{2'}, C_{6'}), 121.3 (C₂, C₆), 124.3 (C_{4'}), 125.4 (C₄), 129.8 (C_{3'}, C_{5'}), 131.7 (C₃, C₅), 139.5 (C_{1'}), 143.4 (C₁), 170.5, 171.6, 171.8 (3CO).

MS (ESI): 466.1 [(M-H)⁻].

HPLC-MS, t_r (min): 11.99.

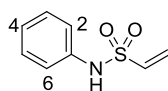
HRMS (ESI): Calculada para C₂₇H₃₆N₃O₄ [(M-H)⁻]: 466.2705. Encontrada: 466.2719.

4.3.9. Síntesis de los derivados 70-76

- Intermedios **77** y **78**

***N*-Feniletilensulfonamida (77)**

Sobre una disolución de anilina (245 μ L, 2.7 mmol) y piridina (238 μ L, 3.0 mmol) en acetona anhidra (7.5 mL) se adiciona lentamente y a 0 $^{\circ}$ C, cloruro de 2-cloroetanosulfonilo (309 μ L, 3.0 mmol). La mezcla de reacción se agita a 0-10 $^{\circ}$ C durante toda la noche y se elimina el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se redissuelve en DCM y se lava consecutivamente con disoluciones acuosas saturadas de NaHCO₃, CuSO₄ y NaCl. La fracción orgánica se seca sobre Na₂SO₄, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía (hexano/acetato de etilo, 6:4) en columna para obtener la sulfonamida **77** (148 mg) con un rendimiento del 30%. Los datos espectroscópicos corresponden con los previamente descritos.¹⁴⁴



Rf: 0.29 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

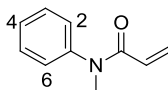
Pf: 67-68 $^{\circ}$ C.

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 5.94 (d, J = 10.0 Hz, 1H, $\frac{1}{2}$ CH₂=), 6.09 (d, J = 16.5 Hz, 1H, $\frac{1}{2}$ CH₂=), 6.66 (dd, J = 16.5, 10.0 Hz, 1H, CH=), 7.06 (tt, J = 6.9, 1.8 Hz, 1H, H₄), 7.21-7.32 (m, 4H, H₂, H₃, H₅, H₆), 8.69 (s a, 1H, NH).

***N*-Fenil-*N*-metilacrilamida (78)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.1. a partir de cloruro de acrilóilo (268 μ L, 3.3 mmol), piridina (268 μ L, 3.3 mmol) y *N*-metilanilina (317 μ L, 3.0 mmol) como un sólido (484 mg) con rendimiento cuantitativo.

Los datos espectroscópicos corresponden con los previamente descritos.¹⁴⁵



Rf: 0.26 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

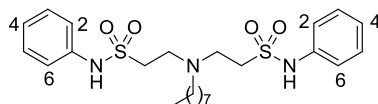
Pf: 75-76 °C. (Lit.¹⁴⁵ 74-76 °C).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 3.37 (s, 3H, CH₃N), 5.52 (dd, *J* = 10.3, 2.0 Hz, 1H, ½CH₂=), 6.08 (dd, *J* = 16.8, 10.4 Hz, 1H, CH=), 6.37 (dd, *J* = 16.8, 2.0 Hz, 1H, ½CH₂=), 7.19 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H₄), 7.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₃, H₅).

- **Compuestos finales 70-76**

2-2'-(Octilimino)bis(*N*-feniletanosulfonamida) (70)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la sulfonamida **77** (140 mg, 0.8 mmol), octilamina (42 µL, 0.3 mmol) y DBU (120 µL, 0.8 mmol) como un aceite (65 mg) con un rendimiento del 44%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 6:4.

Rf: 0.50 (hexano/acetato de etilo, 6:4).

IR (ATR, cm⁻¹): 3247 (NH), 1600, 1496 (Ar), 1340, 1148 (SO₂).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃), 1.02-1.37 (m, 12H, (CH₂)₆CH₃), 2.41 (t ap, *J* = 8.0 Hz, 2H, (CH₂)₆CH₂N), 2.99 (t, *J* = 5.3 Hz, 4H, 2CH₂SO₂), 3.33 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, 2CH₂N), 7.11-7.19 (m, 2H, 2H₄), 7.28-7.37 (m, 8H, 2H₂, 2H₃, 2H₅, 2H₆), 7.95 (s a, 2H, 2NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.1 (CH₃), 22.6, 23.0, 27.4, 29.2, 29.3, 31.8 ((CH₂)₆CH₃), 48.3 (2CH₂N), 49.4 (2CH₂SO₂), 50.7 (CH₂N), 119.5 (2C₂, 2C₆), 124.6 (2C₄), 129.5 (2C₃, 2C₅), 137.3 (2C₁).

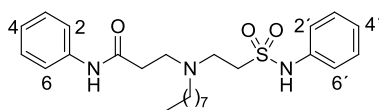
MS (ESI): 496.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 9.07.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₄H₃₆N₃O₄S₂ [(M-H)⁻]: 494.2152. Encontrada: 494.2173.

N³-[2-(Anilinosulfonil)etil]-N¹-fenil-N³-octil-β-alaninamida (71)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la sulfonamida **77** (150 mg, 0.8 mmol), la amina **15** (151 mg, 0.8 mmol) y DBU (122 µL, 0.8 mmol) como un aceite (44 mg) con un rendimiento del 12%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3.

Rf: 0.35 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

IR (ATR, cm^{-1}): 3253 (NH), 1661, 1545 (CON), 1599, 1498, 1466 (Ar), 1376, 1148 (SO_2).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.81 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.04-1.29 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.36 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.35 (t ap, $J = 7.7$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.44 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.71 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.96 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2SO_2), 3.21 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.99-7.12 (m, 4H, $\text{H}_4, \text{H}_2', \text{H}_4', \text{H}_6'$), 7.19-7.32 (m, 5H, $\text{H}_3, \text{H}_5, \text{H}_3', \text{H}_5', \text{NH}$), 7.48 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_2, H_6), 9.12 (s a, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.6, 26.3, 27.5, 29.2, 29.4, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 34.6 (CH_2CO), 47.4 (CH_2SO_2), 48.1 ($\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 50.5 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 53.7 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 119.9, 120.5 ($\text{C}_2, \text{C}_6, \text{C}_2', \text{C}_6'$), 124.1, 125.0 (C_4, C_4'), 128.9, 129.6 ($\text{C}_3, \text{C}_5, \text{C}_3', \text{C}_5'$), 136.9 (C_1'), 138.1 (C_1), 170.8 (CO).

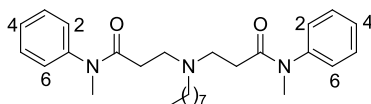
MS (ESI): 460.2 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 8.91.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ [(M+H) $^+$]: 460.2628. Encontrada: 460.2638.

N^1 -Fenil- N^3 -{3-[fenil(metil)amino]-3-oxopropil}- N^1 -metil- N^3 -octil- β -alaninamida (72)

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **78** (325 mg, 2.0 mmol), octilamina (111 μL , 0.7 mmol) y DBU (302 μL , 2.0 mmol) como un aceite (202 mg) con un rendimiento del 64%.



Cromatografía: acetato de etilo.

Rf: 0.37 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 1651 (CON), 1595, 1495, 1454 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.06-1.29 (m, 12H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 2.09 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.14 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H, $2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.60 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H, $2\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.23 (s, 6H, $2\text{CH}_3\text{N}$), 7.15 (d, $J = 7.4$ Hz, 4H, $2\text{H}_2, 2\text{H}_6$), 7.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2H_4), 7.40 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H, $2\text{H}_3, 2\text{H}_5$).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.5 (CH_3CH_2), 23.1, 27.3, 27.8, 29.7, 29.8, 32.1 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 32.2 ($2\text{CH}_2\text{CO}$), 37.7 ($2\text{CH}_3\text{N}$), 50.1 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 54.1 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 127.7 (2C_2 , 2C_6), 128.2 (2C_4), 130.2 (2C_3 , 2C_5), 144.4 (2C_1), 172.3 (2CO).

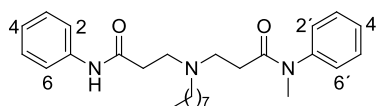
MS (ESI): 451.7 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 8.73.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_2$ [(M+H)⁺]: 452.3271. Encontrada: 452.3286.

***N*'-Fenil-*N*³-{3-[fenil(metil)amino]-3-oxopropil}-*N*³-octil- β -alaninamida (73)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **78** (58 mg, 0.4 mmol), la amina **15** (100 mg, 0.4 mmol) y DBU (81 μL , 0.5 mmol) como un aceite (102 mg) con un rendimiento del 58%.



Cromatografía: acetato de etilo/metanol, 9:1.

Rf: 0.31 (acetato de etilo/metanol, 9:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3306 (NH), 1658, 1547 (CON), 1599, 1497, 1443 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.23 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.47 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.30 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CONCH}_3$), 2.39 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.46 (t ap, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH_2CONH), 2.63 (t ap, $J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.18 (s, 3H, CH_3N), 7.07 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.10 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 7.27-7.42 (m, 5H, H_3 , H_5 , H_3 - H_5), 7.50 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 10.40 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3CH_2), 22.6, 26.6, 27.6, 29.3, 29.5 (5CH_2), 31.5 ($\text{CH}_2\text{CONCH}_3$), 31.8 (CH_2), 33.9 (CH_2CONH), 37.3 (CH_3N), 49.1, 50.3 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 53.4 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 119.8 (C_2 , C_6), 123.5 (C_4), 127.1 (C_2 , C_6), 128.0 (C_4), 128.8 (C_3 , C_5), 129.9 (C_3 , C_5), 138.7 (C_1), 143.7 (C_1), 170.9, 171.2 (2CO).

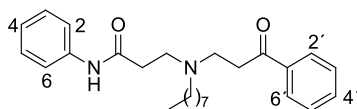
MS (ESI): 438.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 9.57.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_2$ [(M)⁺]: 437.3042. Encontrada: 437.3041.

***N*¹-Fenil-*N*³-octil-*N*³-(3-oxo-3-fenilpropil)-β-alaninamida (74)**

Sobre una disolución de la 3-cloropropiofenona (98 mg, 0.6 mmol) en acetonitrilo (3.0 mL) se añade NaHCO₃ (1 M en H₂O, 0.6 mL, 0.6 mmol) y la amina **15** (160 mg, 0.6 mmol) disuelta en acetonitrilo (1.0 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche y, a continuación, se lava con una disolución acuosa saturada de NaCl. El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 1:1) para obtener el producto deseado como un aceite (105 mg) con un rendimiento del 43%.



Rf: 0.25 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm⁻¹): 3308 (NH), 1681, 1543 (CO, CON), 1598, 1498, 1443 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃), 1.21-1.27 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.55 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.53 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, CH₂CON), 2.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, (CH₂)₆CH₂N), 2.84 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H, NCOCH₂CH₂N), 3.08 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂CO), 3.22 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H, COCH₂CH₂N), 7.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₄), 7.28 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.46 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.51 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H₂, H₆), 7.58 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_{4'}), 7.93 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 10.29 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃), 22.7, 26.8, 27.7, 29.3, 29.6, 31.9 ((CH₂)₆CH₃), 34.1, 35.4 (2CH₂CO), 48.2, 50.8, 53.6 (3CH₂N), 119.8 (C₂, C₆), 123.7 (C₄), 128.1 (C_{2'}, C_{6'}), 128.8 (C_{3'}, C_{5'}), 128.9 (C₃, C₅), 133.4 (C_{4'}), 136.7 (C_{1'}), 138.6 (C₁), 170.9 (CON), 199.0 (CO).

MS (ESI): 409.4 [(M+H)⁺].

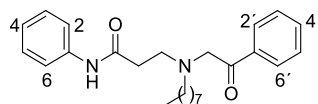
HPLC-MS, t_r (min): 9.74.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₆H₃₆N₂O₂Na [(M+Na)⁺]: 431.2674. Encontrada: 431.2666.

***N*¹-Fenil-*N*³-octil-*N*³-(2-oxo-2-feniletil)-β-alaninamida (75)**

Sobre una disolución de 2-bromoacetofenona (110 mg, 0.6 mmol) y K₂CO₃ (229 mg, 1.7 mmol) en acetonitrilo anhidro (2.5 mL) se añade la amina **15** (145 mg, 0.6 mmol) disuelta en acetonitrilo anhidro (1.0 mL) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, se lava con una disolución acuosa de NaOH 0.1 M y la fase acuosa se extrae con acetato de etilo. El conjunto de extractos orgánicos se seca sobre Na₂SO₄, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo obtenido se purifica por

cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 1:1) para obtener el producto deseado como un aceite (133 mg) con un rendimiento del 56%.



Rf: 0.37 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3269 (NH), 1660, 1547 (CO, CON), 1599, 1496, 1444 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.85 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.20-1.27 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.55 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.60 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2CO), 2.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.98 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4.10 (s, 2H, NCH_2CO), 7.08 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, H_4), 7.33 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.49 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_3' , H_5'), 7.61 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4'), 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 7.98 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, H_2' , H_6'), 10.81 (s a, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.2 (CH_3), 22.7, 26.8, 27.4, 29.5, 29.8, 31.9 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 34.3 (CH_2CO), 50.9 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 54.4 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 60.0 (NCH_2CO), 120.2 (C_2 , C_6), 123.7 (C_4), 128.0 (C_2' , C_6'), 128.9 (C_3 , C_5), 129.0 (C_3' , C_5'), 133.9 (C_4'), 134.4 (C_1'), 139.0 (C_1), 170.4 (CON), 197.3 (CO).

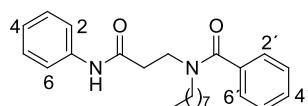
MS (ESI): 394.8 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 13.88.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_2$ [(M+H) $^+$]: 395.2698. Encontrada: 395.2680.

N^3 -Benzoil- N^1 -fenil- N^3 -octil- β -alaninamida (76)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (167 mg, 0.6 mmol), ácido benzoico (74 mg, 0.6 mmol), EDC (94 mg, 0.6 mmol) y HOBt (81 mg, 0.6 mmol) como un sólido (164 mg) con un rendimiento del 72%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 9:1.

Rf: 0.28 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

Pf: 65-67 $^{\circ}\text{C}$.

IR (ATR, cm^{-1}): 3307 (NH), 1686 (CON), 1607, 1546, 1498, 1439 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.85 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.09-1.15 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.50 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.75 (m, 2H, CH_2CO), 3.25 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 3.81 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.04 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.21-7.27 (m, 2H, H_3 , H_5), 7.32-7.40 (m, 5H, H_3 , H_5 , H_2 , H_4 , H_6), 7.51 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 9.35 (s a, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.0 (CH_3), 22.6, 26.4, 28.8, 29.0 (2C), 31.7 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 36.2 (CH_2CO), 42.6 (CH_2N), 50.6 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 119.9 (C_2 , C_6), 123.9 (C_4), 126.4 (C_2 , C_6), 128.5 (C_3 , C_5), 128.8 (C_3 , C_5), 129.5 (C_4), 136.4 (C_1), 138.6 (C_1), 169.8, 172.7 (2CO).

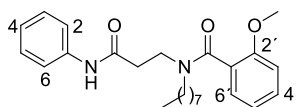
MS (ESI): 381.2 [(M+H) $^+$].

Anal.: ($\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$) C, H, N.

4.3.10. Síntesis de los compuestos 79-92

***N*¹-Fenil-*N*³-(2-metoxifenilcarbonil)-*N*³-octil- β -alaninamida (79)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 2-metoxibenzoico (46 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBT (41 mg, 0.3 mmol) como un aceite (86 mg) con un rendimiento del 70%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 1:1.

Rf: 0.42 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3270 (NH), 1686, 1547 (CON), 1599, 1498, 1441 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): Mezcla de rotámeros A:B, 9:1; 0.86 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3CH_2), 1.08-1.31 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.44-1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ rotámero A), 1.52-1.73 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ rotámero B), 2.17 (m, 2H, CH_2CO rotámero B), 2.39-2.48 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$ rotámero B), 2.80-2.85 (m, 2H, CH_2CO rotámero A), 3.13-3.20 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$ rotámero A), 3.42-3.57 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ rotámero B), 3.67 (s, 3H, CH_3O rotámero A), 3.72-4.06 (m, 5H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ rotámero A, CH_3O rotámero B), 6.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_3), 6.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_5), 7.04 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.19 (dd, $J = 7.4$, 1.7 Hz, 1H, H_6), 7.24 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.32 (td, $J = 7.1$, 1.7 Hz, 1H, H_4), 7.53 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 9.47 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$), 22.7, 26.5, 28.6, 29.1 (2C), 31.8 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_6\text{CH}_3$), 36.3 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 42.0 (CH_2N), 49.9 ($(\text{CH}_2)_6\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 55.4 (CH_3O), 110.9 ($\text{C}_{3'}$), 120.0 (C_2 , C_6), 120.8 ($\text{C}_{5'}$), 123.7 (C_4), 125.9 ($\text{C}_{1'}$), 127.6 ($\text{C}_{6'}$), 128.7 (C_3 , C_5), 130.5 (C_4'), 138.8 (C_1), 155.2 ($\text{C}_{2'}$), 170.0, 170.5 (2CO).

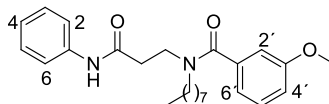
MS (ESI): 411.2 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 10.68.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}$ [(M+Na) $^+$]: 433.2467. Encontrada: 433.2466.

***N*¹-Fenil-*N*³-(3-metoxifenilcarbonil)-*N*³-octil- β -alaninamida (80)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.6., a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 3-metoxibenzoico (46 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBT (41 mg, 0.3 mmol) como un aceite (83 mg) con un rendimiento del 67%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 1:1.

Rf: 0.48 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3273 (NH), 1687, 1547 (CON), 1601, 1498, 1442 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): Mezcla de rotámeros A:B, 9:1; 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, $\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$), 1.12-1.27 (m, 10H, $(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_5\text{CH}_3$), 1.52 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.48 (m, 2H, CH_2CO rotámero B), 2.77 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2CO rotámero A), 3.27 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$ rotámero A), 3.45 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$ rotámero B), 3.69 (s, 3H, CH_3O), 3.81-3.92 (m, 2H, $\text{COCH}_2\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 6.83 (s, 1H, $\text{H}_{2'}$), 6.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 6.91 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.23-7.29 (m, 3H, H_3 , H_5 , H_6), 7.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 9.39 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_3\text{CH}_2$), 22.7, 26.5, 28.9, 29.1, 29.2, 31.8 ($(\underline{\text{C}}\text{H}_2)_6\text{CH}_3$), 36.2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{CO}$), 42.7 (CH_2N), 50.7 ($(\text{CH}_2)_6\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{N}$), 55.3 (CH_3O), 111.7 ($\text{C}_{2'}$), 115.6 ($\text{C}_{6'}$), 118.6 ($\text{C}_{5'}$), 120.0 (C_2 , C_6), 124.0 (C_4), 128.9 (C_3 , C_5), 129.8 ($\text{C}_{4'}$), 137.6 ($\text{C}_{1'}$), 138.6 (C_1), 159.7 ($\text{C}_{3'}$), 169.9, 172.6 (2CO).

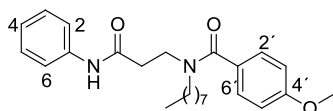
MS (ESI): 411.1 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 10.80.

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3$ [(M-H) $^-$]: 409.2496. Encontrada: 409.2491.

***N*¹-Fenil-*N*³-(4-metoxifenilcarbonil)-*N*³-octil-β-alaninamida (81)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (50 mg, 0.2 mmol), ácido 4-metoxibenzoico (30 mg, 0.2 mmol), EDC (20 mg, 0.2 mmol) y HOBt (23 mg, 0.2 mmol) como un aceite (60 mg) con un rendimiento del 73%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3 a 3:7.

R_f: 0.31 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

IR (ATR, cm⁻¹): 3309 (NH), 1688, 1547 (CON), 1607, 1504, 1441 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): 0.86 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.14-1.26 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.53 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.77 (m, 2H, CH₂CO), 3.32 (m, 2H, (CH₂)₆CH₂N), 3.81-3.86 (m, 5H, COCH₂CH₂N, CH₃O), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₄), 7.29 (t, *J* = 9.2 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.30 (m, 2H, H₂, H₆), 7.56 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₂, H₆), 9.31 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃CH₂), 22.7, 26.6, 28.9, 29.2 (2C), 31.8 ((CH₂)₆CH₃), 36.4 (CH₂CO), 42.8 (CH₂N), 50.9 ((CH₂)₆CH₂N), 55.4 (CH₃O), 113.8 (C_{3'}, C_{5'}), 120.0 (C₂, C₆), 124.0 (C₄), 128.5 (C₃, C₅), 128.9 (C_{2'}, C_{6'}), 138.6 (C₁), 143.0 (C_{1'}), 160.7 (C_{4'}), 169.9, 172.9 (2CO).

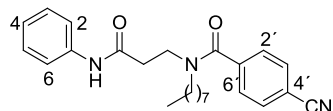
MS (ESI): 411.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 10.75.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₅H₃₄N₂O₃Na [(M+Na)⁺]: 433.2467. Encontrada: 433.2450.

***N*³-(4-Cianofenilcarbonil)-*N*¹-fenil-*N*³-octil-β-alaninamida (82)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (50 mg, 0.2 mmol), ácido 4-cianobenzoico (22 mg, 0.2 mmol), EDC (20 mg, 0.2 mmol) y HOBt (23 mg, 0.2 mmol) como un sólido (55 mg) con un rendimiento del 68%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 1:1.

Rf: 0.30 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

Pf: 90-91 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3311 (NH), 2232 (CN), 1686, 1611, 1545 (CON), 1498, 1439 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): Mezcla rotámeros A:B, 9:1; 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.10-1.27 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.50 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ rotámero A), 1.66 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ rotámero B), 2.49 (m, 2H, CH_2CO rotámero B), 2.78 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2CO rotámero A), 3.22 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$ rotámero A), 3.50 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$ rotámero B), 3.60 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ rotámero B), 3.84 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ rotámero A), 7.01 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_4), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.42 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_3' , H_5'), 7.49 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 7.65 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_2' , H_6'), 8.13 (s a, 1H, NH rotámero B), 9.02 (s a, 1H, NH rotámero A).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.6, 26.4, 28.8, 29.0 (2C), 31.7 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 35.8 (CH_2CO), 42.6 (CH_2N), 50.6 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 113.4 (C_4), 118.0 (CN), 119.9 (C_2 , C_6), 124.2 (C_4), 127.2 (C_3' , C_5'), 128.9 (C_3 , C_5), 132.5 (C_2' , C_6'), 138.2 (C_1), 140.7 (C_1'), 169.3, 170.6 (2CO).

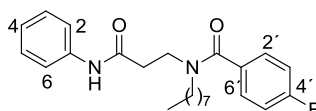
MS (ESI): 406.3 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 10.68.

Anal.: ($\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$) C, H, N.

N^1 -Fenil- N^3 -(4-fluorofenilcarbonil)- N^2 -octil- β -alaninamida (83)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 4-fluorobenzoico (42 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un sólido (86 mg) con un rendimiento del 72%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3 a 3:7.

Rf: 0.42 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

Pf: 76-77 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3306, 3136 (NH), 1688, 1666, 1546 (CON), 1602, 1499, 1442 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.11-1.26 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.75 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, CH_2CO), 3.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 3.82 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 7.03 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_2' , H_6'), 7.07 (t, $J = 7.4$ Hz,

Parte experimental

1H, H₄), 7.27 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H₃, H₅), 7.32 (dd, $J = 8.4, 5.5$ Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}), 7.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H₂, H₆), 9.29 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃), 22.7, 26.5, 28.9, 29.1 (2C), 31.8 ((CH₂)₆CH₃), 36.1 (CH₂CO), 42.8 (CH₂N), 50.8 ((CH₂)₆CH₂N), 115.7 (d, $J = 21.6$ Hz, C_{3'}, C_{5'}), 119.9 (C₂, C₆), 124.1 (C₄), 128.7 (d, $J = 8.4$ Hz, C_{2'}, C_{6'}), 128.9 (C₃, C₅), 132.5 (C_{1'}), 138.2 (C₁), 163.3 (d, $J = 248.3$ Hz, C_{4'}), 169.7, 171.8 (2CO).

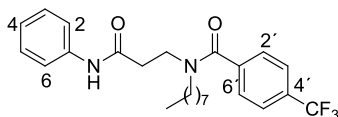
MS (ESI): 399.1 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 10.88.

Anal.: (C₂₄H₃₁FN₃O₂) C, H, N.

N¹-Fenil-N³-octil-N³-[4-(trifluorometil)fenilcarbonil]-β-alaninamida (84)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 4-(trifluorometil)benzoico (57 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un sólido (89 mg) con un rendimiento del 66%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3 a 1:1.

Rf: 0.53 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

Pf: 80-81 °C.

IR (ATR, cm⁻¹): 3307 (NH), 1688, 1666, 1615, 1546 (CON), 1499, 1443 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): Mezcla de rotámeros A:B, 9:1; 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH₃), 1.12-1.28 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.53 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃ rotámero A), 1.69 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃ rotámero B), 2.51 (m, 2H, CH₂CO rotámero B), 2.83 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂CO rotámero A), 3.26 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, (CH₂)₆CH₂N rotámero A), 3.53 (m, 2H, (CH₂)₆CH₂N rotámero B), 3.64 (m, 2H, COCH₂CH₂N rotámero B), 3.88 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, COCH₂CH₂N rotámero A), 7.10 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H₄), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H₃, H₅), 7.45 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'} rotámero A), 7.50 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H₂, H₆), 7.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'} rotámero A), 7.72 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'} rotámero B), 8.17 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H₃, H₅ rotámero B), 9.25 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.1 (CH₃), 22.6, 26.4, 28.8, 29.0, 29.1, 31.7 ((CH₂)₆CH₃), 35.9 (CH₂CO), 42.8 (CH₂N), 50.7 ((CH₂)₆CH₂N), 120.0 (C₂, C₆), 124.2 (C₄), 125.7 (q, $J = 3.6$ Hz, C_{3'}, C_{5'}), 126.9 (C_{2'}, C_{6'}), 127.3 (q, $J = 270.5$ Hz, CF₃), 128.9 (C₃, C₅), 131.7 (q, $J = 32.6$ Hz, C_{4'}), 138.3 (C₁), 139.9 (C_{1'}), 169.6, 171.3 (2CO).

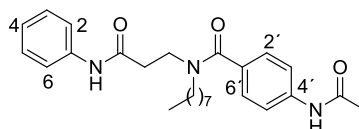
MS (ESI): 449.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 11.64.

Anal.: (C₂₅H₃₁F₃N₂O₂) C, H, N.

N³-(4-Acetamidofenilcarbonil)-N¹-fenil-N³-octil-β-alaninamida (85)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 4-acetamidobenzoico (54 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un aceite (92 mg) con un rendimiento del 70%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 2:8.

Rf: 0.19 (hexano/acetato de etilo, 2:8).

IR (ATR, cm⁻¹): 3300 (NH), 1669, 1535 (CON), 1602, 1468, 1438 (Ar).

¹H-RMN (CDCl₃, δ): Mezcla de rotámeros A:B, 8:2; 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃CH₂), 1.16-1.29 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.49-1.62 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃ rotámeros A y B), 1.97 (s, 3H, CH₃CO rotámero B), 2.15 (s, 3H, CH₃CO rotámero A), 2.22 (m, 2H, CH₂CO rotámero B), 2.76 (m, 2H, CH₂CO rotámero A), 3.26 (m, 2H, (CH₂)₆CH₂N rotámero A), 3.45 (m, 2H, (CH₂)₆CH₂N rotámero B), 3.60 (m, 2H, COCH₂CH₂N rotámero B), 3.83 (m, 2H, COCH₂CH₂N rotámero A), 7.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H₄), 7.20 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H₂', H₆'), 7.27 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H, H₃, H₅), 7.44 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H₃', H₅'), 7.53 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H₂, H₆), 8.15 (s a, 1H, NH), 9.19 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.2 (CH₃CH₂), 22.7 (CH₂), 24.6 (CH₃CO), 26.6, 26.7, 29.0, 29.2, 31.8 (5CH₂), 36.3 (CH₂CO), 42.6 (CH₂N), 50.8 ((CH₂)₆CH₂N), 119.7 (C₃', C₅'), 120.1 (C₂, C₆), 124.2 (C₄), 127.6 (C₂', C₆'), 129.0 (C₃, C₅), 131.8 (C₁'), 138.4 (C₁), 139.5 (C₄'), 169.0, 169.1, 169.9 (3CO).

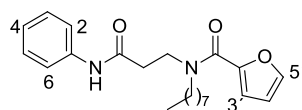
MS (ESI): 438.2 [(M+H)⁺].

HPLC-MS, t_r (min): 9.93.

HRMS (ESI): Calculada para C₂₆H₃₅N₃O₃Na [(M+Na)⁺]: 460.2570. Encontrada: 460.25833.

N¹-Fenil-N³-(2-furoil)-N³-octil-β-alaninamida (86)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 2-furoico (34 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un sólido (106 mg) con un rendimiento del 95%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 1:1.

Rf: 0.40 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3315 (NH), 1668 (CON), 1605 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.87 (t, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH_3), 1.25 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.65 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.75 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2CO), 3.61 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 3.83 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.43 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 6.95 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 7.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.27 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.41 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.49-7.60 (m, 2H, H_2 , H_6), 9.29 (s, 1H, NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.6, 26.8, 29.2, 29.3, 29.7, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 36.2 (CH_2CO), 44.3 (CH_2N), 49.6 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 111.4, 116.5 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{4'}$), 119.9 (C_2 , C_6), 123.9 (C_4), 128.8 (C_3 , C_5), 138.5 (C_1), 144.0 ($\text{C}_{5'}$), 147.9 ($\text{C}_{2'}$), 160.5 (CON), 169.6 (CONH).

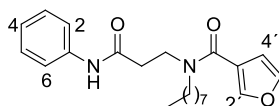
MS (ESI): 371.2 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 12.73.

Anal.: ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$) C, H, N.

N^1 -Fenil- N^3 -(3-furoil)- N^3 -octil- β -alaninamida (87)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 2-furoico (34 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBT (41 mg, 0.3 mmol) como un sólido (111 mg) con un rendimiento cuantitativo.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3.

Rf: 0.14 (hexano/acetato de etilo, 7:3).

IR (ATR, cm^{-1}): 3281 (NH), 1685 (CON), 1605, 1547, 1501, 1441 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.25 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.61 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.76 (m, 2H, CH_2CO), 3.44 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 3.82 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.55 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7.08 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.29 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.41 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{5'}$), 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 7.68 (m, 1H, H_2).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.6, 26.6, 29.2 (3C), 31.7 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 36.5 (CH_2CO), 43.2 (CH_2N), 50.1 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 110.1 (C_4'), 119.8 (C_2 , C_6), 121.3 (C_3'), 124.1 (C_4), 128.9 (C_3 , C_5), 138.3 (C_1), 143.1, 143.2 (C_2' , C_5'), 165.6 (CON), 169.4 (CONH).

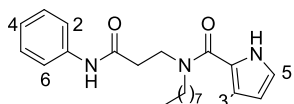
MS (ESI): 371.2 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 10.56.

Anal.: ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$) C, H, N.

***N*'-Fenil-*N*³-octil-*N*³-(1*H*-pirrol-2-ilcarbonil)- β -alaninamida (88)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 1*H*-2-pirrolcarboxílico (34 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un sólido (84 mg) con un rendimiento del 76%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3.

Rf: 0.40 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

Pf: 105-107 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3264 (NH), 1666 (CON), 1599, 1548, 183, 1445 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.28-1.31 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.71 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.74 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, CH_2CO), 3.58 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 3.87 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.25-6.28 (m, 1H, H_4'), 6.54 (m, 1H, H_3'), 6.90 (m, 1H, H_5'), 7.07 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_4), 7.28 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 8.84 (s a, 1H, NH), 9.84 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.6, 26.8, 28.6, 29.2, 29.4, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 36.7 (CH_2CO), 44.3 (CH_2N), 49.3 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 110.3, 112.2 (C_3' , C_4'), 119.9 (C_2 , C_6), 121.3 (C_5'), 124.1 (C_4), 124.4 (C_2'), 128.9 (C_3 , C_5), 138.3 (C_1), 162.5 (CON), 169.4 (CONH).

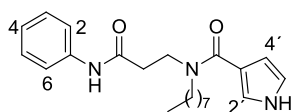
MS (ESI): 370.2 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 11.86.

Anal.: ($\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$) C, H, N.

***N*'-Fenil-*N*³-octil-*N*³-(1*H*-pirrol-3-ilcarbonil)- β -alaninamida (89)**

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido 1*H*-3-pirrolcarboxílico (34 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un sólido (60 mg) con un rendimiento del 54%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 3:7.

Rf: 0.25 (acetato de etilo).

Pf: 99-101 °C.

IR (ATR, cm^{-1}): 3250 (NH), 1598 (CON), 1548 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.79 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.16 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.54 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.61 (m, 2H, CH_2CO), 3.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 3.74 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 6.26 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 6.56 (m, 1H, $\text{H}_{5'}$), 6.92 (m, 1H, H_2), 6.97 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.18 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.49 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 9.37 (s a, 2H, 2NH).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.6, 26.7, 28.9, 29.2, 29.3, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 36.6 (CH_2CO), 43.4 (CH_2N), 49.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 108.6 ($\text{C}_{4'}$), 118.3 ($\text{C}_{5'}$), 118.4 ($\text{C}_{3'}$), 120.0 (C_2 , C_6), 121.1 ($\text{C}_{2'}$), 123.9 (C_4), 128.8 (C_3 , C_5), 138.5 (C_1), 168.4, 170.0 (2CO).

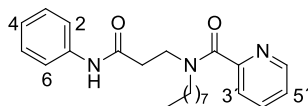
MS (ESI): 370.2 [(M+H) $^+$].

HPLC-MS, t_r (min): 8.63.

Anal.: ($\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$) C, H, N.

N' -Fenil- N'' -octil- N' -(piridin-2-ilcarbonil)- β -alaninamida (90)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido picolínico (37 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un aceite (105 mg) con un rendimiento del 92%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 2:8.

Rf: 0.30 (hexano/acetato de etilo, 3:7).

IR (ATR, cm^{-1}): 3309 (NH), 1685 (CON), 1615, 1547, 1495, 1443 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): Mezcla de rotámeros A:B, 2:1; 0.85 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.11-1.25 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.57 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.81 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2CO), 3.37 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$, rotámero A), 3.46-3.47 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$, rotámero B), 3.69-3.75 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, rotámero B), 3.87 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$,

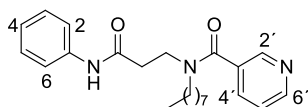
rotámero A), 7.05 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, H₄), 7.24-7.32 (m, 3H, H₃, H₅, H_{5'}), 7.54-7.56 (m, 3H, H₂, H₆, H_{4'}), 7.71-7.76 (m, 1H, H_{3'}), 8.55 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H_{6'}), 8.64 (s a, 1H, NH, rotámero B), 8.92 (s a, 1H, NH, rotámero A).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.0 (CH₃), 22.6, 26.5, 28.8, 29.0 (2C), 31.7 ((CH₂)₆CH₃), 36.5 (CH₂CO), 43.2 (CH₂N), 50.0 ((CH₂)₆CH₂N), 119.9 (C₂, C₆), 123.1, 123.9, 124.4 (C₄, C_{3'}, C_{5'}), 128.8 (C₃, C₅), 137.0 (C_{4'}), 138.4 (C₁), 148.5 (C_{6'}), 154.5 (C_{2'}), 169.5, 169.7 (2CO).

HRMS (ESI): Calculada para C₂₃H₃₁N₃O₂Na [(M+Na)⁺]: 404.2308. Encontrada: 404.2276.

N¹-Fenil-N³-octil-N³-(piridin-3-ilcarbonil)-β-alaninamida (91)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido nicotínico (37 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un aceite (41 mg) con un rendimiento del 36%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 2:8.

Rf: 0.28 (acetato de etilo).

IR (ATR, cm⁻¹): 3312 (NH), 1685 (CON), 1612, 1546, 1495, 1440 (Ar).

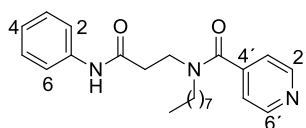
¹H-RMN (CDCl₃, δ): Mezcla de rotámeros A:B, 6:1; 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃), 1.13-1.18 (m, 10H, (CH₂)₅CH₃), 1.53 (m, 2H, CH₂(CH₂)₅CH₃), 2.50 (m, 2H, CH₂CO, rotámero B), 2.79 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, CH₂CO, rotámero A), 3.28 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, (CH₂)₆CH₂N, rotámero A), 3.49 (m, 2H, (CH₂)₆CH₂N, rotámero B), 3.64 (m, 2H, COCH₂CH₂N, rotámero B), 3.86 (m, 2H, COCH₂CH₂N, rotámero A), 7.07 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H₄), 7.24-7.32 (m, 3H, H₃, H₅, H_{5'}), 7.53 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H₂, H₆), 7.67 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H_{4'}), 8.64 (d, $J = 1.4$ Hz, 2H, H_{2'}, H_{6'}), 9.27 (s a, 1H, NH).

¹³C-RMN (CDCl₃, δ): 14.0 (CH₃), 22.5, 26.4, 28.9, 29.0 (2C), 31.6 ((CH₂)₆CH₃), 35.8 (CH₂CO), 42.7 (CH₂N), 50.7 ((CH₂)₆CH₂N), 119.9 (C₂, C₆), 123.4 (C_{5'}), 124.1 (C₄), 128.8 (C₃, C₅), 132.4 (C_{3'}), 134.2 (C_{4'}), 138.3 (C₁), 147.3, 150.6 (C_{2'}, C_{6'}), 169.5, 169.8 (2CO).

HRMS (ESI): Calculada para C₂₃H₃₁N₃O₂Na [(M+Na)⁺]: 404.2308. Encontrada: 404.2302.

N¹-Fenil-N³-octil-N³-(piridin-4-ilcarbonil)-β-alaninamida (92)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de la amina **15** (85 mg, 0.3 mmol), ácido isonicotínico (37 mg, 0.3 mmol), EDC (47 mg, 0.3 mmol) y HOBt (41 mg, 0.3 mmol) como un aceite (47 mg) con un rendimiento del 41%.



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 2:8.

Rf: 0.19 (acetato de etilo).

IR (ATR, cm^{-1}): 3310 (NH), 1624 (CON), 1547 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): Mezcla de rotámeros A:B, 4:1): 0.76 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3), 1.02-1.07 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.41 (qt, $J = 6.9$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.40 (m, 2H, CH_2CO , rotámero B), 2.70 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2CO , rotámero A), 3.12 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$, rotámero A), 3.41 (m, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$, rotámero B), 3.50 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, rotámero B), 3.74 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, rotámero A), 7.00 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_4), 7.11 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, $\text{H}_{3'}$, $\text{H}_{5'}$), 7.16-7.21 (m, 2H, H_3 , H_5), 7.41 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 8.55 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{6'}$), 8.78 (s a, 1H, NH).

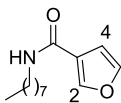
^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.0 (CH_3), 22.5, 26.4, 28.8, 29.0 (2C), 31.6 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 35.9 (CH_2CO), 42.4 (CH_2N), 50.4 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 119.8 (C_2 , C_6), 120.8 ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$), 124.2 (C_4), 128.9 (C_3 , C_5), 138.2 (C_1), 144.1 ($\text{C}_{4'}$), 150.3 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$), 169.2, 169.9 (CO, rotámeros A y B), 171.1 (CO).

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2\text{Na}$ [(M+Na) $^+$]: 404.2308. Encontrada: 404.2311.

4.3.12. Síntesis del compuesto 93

N-Octilfuran-3-carboxamida (94)

Obtenida usando el procedimiento 4.3.1.5. a partir de octilamina (575 μL , 3.5 mmol), ácido 3-furoico (400 mg, 3.5 mmol), EDC (689 mg, 3.5 mmol) y HOBt (487 mg, 3.5 mmol) como un sólido (782 mg) con rendimiento cuantitativo.



Cromatografía: DCM.

Rf: 0.28 (DCM).

Pf: 71-72 $^{\circ}\text{C}$.

IR (ATR, cm^{-1}): 3304 (NH), 1636 (CON), 1583, 1541 (Ar).

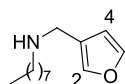
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.27-1.32 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.58 (qt, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 3.39 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2N), 5.75 (s a, 1H, NH), 6.59 (dd, $J = 1.0, 0.8$ Hz, 1H, H_4), 7.42 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_5), 7.91 (m, 1H, H_2).

$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.6, 27.0, 29.2, 29.3, 29.7, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 39.6 (CH_2N), 108.2 (C_4), 122.8 (C_3), 143.7, 144.5 (C_2, C_5), 162.6 (CO).

MS (ESI) : 224.2 [(M+H) $^+$].

***N*-(3-Furilmetil)-*N*-octilamina (95)**

A una suspensión de LiAlH_4 (120 mg, 3.0 mmol) en THF anhidro (3.5 mL), se añade gota a gota una disolución de la amida **94** (220 mg, 1.5 mmol) en THF anhidro (2.0 mL) y la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante toda la noche. A continuación, se añade agua (4.0 mL) gota a gota y a 0 °C. El crudo de reacción se filtra y se extrae con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se purifica por cromatografía en columna (hexano/acetato de etilo, 7:3), obteniéndose la amina **95** como un aceite (179 mg) con un rendimiento del 57%.



Rf: 0.24 (hexano/acetato de etilo, 6:4).

IR (ATR, cm^{-1}): 3109 (NH), 1629, 1508, 1461 (Ar).

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 0.87 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3), 1.27 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.47-1.51 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.62 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 3.64 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}_{\text{furan}}$), 6.38 (m, 1H, H_4), 7.34-7.37 (m, 2H, H_2, H_5).

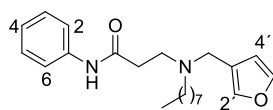
$^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , δ): 14.1 (CH_3), 22.7, 27.4, 29.3, 29.5, 30.0, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 44.4, 49.5 ($2\text{CH}_2\text{N}$), 110.5 (C_4), 124.1 (C_3), 139.8 (C_5), 143.0 (C_2).

MS (ESI) : 210.2 [(M+H) $^+$].

***N*³-(3-Furilmetil)-*N*³-octil-*N*¹-fenil- β -alaninamida (93)**

Obtenida utilizando el procedimiento 4.3.1.4. a partir de la acrilamida **14** (34 mg, 0.2 mmol), la amina **95** (50 mg, 0.2 mmol) y DBU (41 μL , 0.2 mmol) como un aceite (14 mg) con un rendimiento del 20%.

Parte experimental



Cromatografía: hexano/acetato de etilo, 7:3

Rf: 0.34 (hexano/acetato de etilo, 1:1).

IR (ATR, cm^{-1}): 3268 (NH), 1676 (CON), 1601, 1549, 1444 (Ar).

^1H -RMN (CDCl_3 , δ): 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3), 1.23-1.28 (m, 10H, $(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 1.57-1.62 (m, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 2.54-2.61 (m, 4H, CH_2CO , $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{N}$), 2.84 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.63 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}_{\text{furan}}$), 6.35 (m, 1H, $\text{H}_{4'}$), 7.08 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H_4), 7.31 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H, H_3 , H_5), 7.39-7.40 (m, 2H, $\text{H}_{2'}$, $\text{H}_{5'}$), 7.52 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, H_2 , H_6), 10.71 (s a, 1H, NH).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , δ): 14.0 (CH_3), 22.6, 26.4, 27.5, 29.2, 29.4, 31.8 ($(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$), 33.4 (CH_2CO), 47.2, 49.8, 53.0 ($3\text{CH}_2\text{N}$), 111.2 ($\text{C}_{4'}$), 119.8 (C_2 , C_6), 123.8 (C_4), 128.9 (C_3 , C_5), 138.6 (C_1), 141.3 (C_3'), 141.4, 143.7 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{5'}$), 165.0 (CO).

HRMS (ESI): Calculada para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}$ [(M+Na) $^+$]: 379.2356. Encontrada: 379.2343.

Tabla 11. Análisis elemental de los compuestos finales sólidos.

Comp.	Fórmula Molecular	Calculado			Encontrado		
		C	H	N	C	H	N
47	$\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{FN}_3\text{O}_2$	70.72	8.22	9.52	70.23	8.23	9.29
48	$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_2$	65.97	7.38	8.55	66.43	7.36	8.45
76	$\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2$	75.75	8.48	7.36	75.45	8.21	7.41
82	$\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$	74.04	7.70	10.36	73.81	7.54	10.19
83	$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{FN}_2\text{O}_2$	72.33	7.84	7.03	72.41	7.78	6.98
84	$\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$	66.95	6.97	6.25	66.43	6.73	6.01
86	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$	71.32	8.16	7.56	71.35	8.03	7.30
87	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$	71.32	8.16	7.56	71.15	7.91	7.61
88	$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$	71.51	8.46	11.37	71.29	8.01	11.35
89	$\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$	71.51	8.46	11.37	71.40	8.22	11.18

4.4. Ensayos de estabilidad

4.4.1. Estabilidad en suero

Sobre 900 μL de suero humano (Sigma Aldrich) o de ratón (Europa Bioproducts) previamente termostatizado a 37 °C se añadieron 300 μL de una disolución 2 mM del compuesto objeto de estudio en PBS y la mezcla se incubó a 37 °C durante el tiempo de interés. Una vez transcurrido este tiempo, 200 μL de la mezcla se añadieron sobre 200 μL de acetonitrilo frío, se agitó y se incubó durante 10 min en hielo para precipitar las proteínas. El sobrenadante se separó del precipitado por centrifugación a 39000g durante 10 min y se hizo pasar a través de un filtro de teflón de tamaño de poro 0.22 μm (Albet Labscience). A continuación, 50 μL del sobrenadante filtrado se analizaron mediante HPLC-MS en un espectrómetro Agilent 1200LC-MSD VL, empleando una columna Eclipse XDB-C18 (5 μm , 4.6 mm x 150 mm) junto con una precolumna (5 μm , 4.6 mm x 12.5 mm). La fase móvil empleada consistió en un gradiente de disoluciones A (agua:metanol 95:5) y B (agua:metanol 5:95) con un 0.1% de hidróxido amónico y 0.1% de ácido fórmico como aditivos. En todos los casos se usó un flujo constante de 0.5 mL/min, un tiempo total de 15 minutos y el siguiente gradiente: 0 min, 60% A; 1 min, 100% B; 1-14 min, 100% B; 15 min, 60% A. El análisis de EM se llevó a cabo utilizando la técnica de ionización ESI en modo positivo SIM. El voltaje del capilar fue de 3.0 kV y el voltaje del fragmentador de 70 eV. La temperatura del gas secante fue de 350 °C, el flujo de 10 L/min y la presión del nebulizador de 20 psi.

4.4.2. Estabilidad en microsomas

Sobre 1185 μL de PBS termostatizado a 37 °C, se añadieron 150 μL de una disolución 10 mM de NADPH (Sigma Aldrich) en PBS y 15 μL de una disolución 1 mM del compuesto objeto de estudio en PBS, y la mezcla se incubó durante 5 min a 37 °C. A continuación se añadieron 150 μL de una suspensión de microsomas humanos (Sigma Aldrich) o de ratón (Sigma Aldrich) a una concentración de 5 mg/mL y se incubó a 37 °C durante el tiempo de interés, siendo las concentraciones finales de compuesto, NADPH y microsomas en la mezcla de 10 μM , 1 mM y 0.5 mg/mL, respectivamente. Una vez transcurrido este tiempo, 250 μL de la mezcla se añadieron sobre 250 μL de acetonitrilo frío, se agitó y se incubó durante 10 min en hielo para precipitar las proteínas. El sobrenadante se separó del precipitado por centrifugación a 10000g durante 5 min y se hizo pasar a través de un filtro de teflón de tamaño de poro 0.22 μm (Albet Labscience). A

continuación, 50 µL del sobrenadante filtrado se analizaron mediante HPLC-MS de forma análoga a la descrita para el caso anterior.

4.5. Experimentos biológicos

4.5.1. Líneas celulares y cultivos

Las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD), mientras que el grupo del profesor Carlos López Otín de la Universidad de Oviedo nos proporcionó los fibroblastos AF3 con la mutación $Lmna^{G609G/G609G}$. Para todas ellas se utilizó un medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle medium* (DMEM, Invitrogen) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado térmicamente (FBS, HyClone), 1% de L-glutamina (Invitrogen), 1% de piruvato sódico (Invitrogen), 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (Invitrogen). Las células PC-3 se obtuvieron de ATCC y se incubaron con medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI, Invitrogen) suplementado con un 10% de FBS inactivado térmicamente, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato sódico, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina. En todos los casos, las células se incubaron en atmósfera húmeda a 37 °C en presencia de un 5% de CO₂.

4.5.2. Visualización de Ras

Se sembraron células PC-3 a una densidad de 2×10^4 células/pocillo sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro previamente tratados con hidrobromuro de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 24 h a 37 °C y con un 5% de CO₂ en medio RPMI suplementado con un 10% de FBS. Trascurrido este tiempo, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco con las concentraciones indicadas de *cysmethynil*, el compuesto **UCM1336** o DMSO y las células se incubaron durante 96 h, reemplazando el medio después de las primeras 48 h. Las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con una disolución de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) y se permeabilizaron con PBS-T (PBS con 0.1% de Triton X-100, Sigma-Aldrich). La incubación con el anticuerpo primario anti-Ras de ratón (1:200, Thermo Scientific) en PBS con un 4% de suero normal de cabra (*normal goat serum*, NGS) se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave durante 2 h. A continuación, las células se

lavarón dos veces con PBS-T y se incubaron durante 1 hora más en ausencia de luz con el anticuerpo Alexa Fluor 488 *goat anti-mouse* (1:1500, Life Technologies) diluido en PBS con un 1% de NGS. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS-T y se incubaron con Hoechst 33258 (5 µg/mL, Sigma-Aldrich) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente para visualizar los núcleos celulares. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS-T y los cubreobjetos se montaron cuidadosamente con Immumount (Thermo Scientific) sobre portaobjetos. La visualización se llevó a cabo usando un microscopio confocal invertido Olympus IX83 provisto de un objetivo 60X *oil immersion* y los filtros adecuados de excitación y emisión. Las imágenes mostradas son representativas de 3 a 5 experimentos independientes.

4.5.3. Determinación de los niveles de Ras-GTP

Los niveles de Ras-GTP se determinaron empleando un kit comercializado por Thermo Scientific. Para ello, se sembraron 2×10^6 células PC3 y se incubaron con medio RPMI suplementado con un 10% de FBS, a 37 °C y un 5% de CO₂. Tras 24 h, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco con una concentración 25 µM de *cysmethynil*, 10 µM del compuesto **UCM1336** o un volumen equivalente de DMSO como control, y las células se incubaron durante 48 h a 37 °C y con un 5% de CO₂. En este punto, el medio se reemplazó de nuevo por medio fresco con el correspondiente compuesto o DMSO, y se continuó con la incubación durante 48 h más. A continuación, tras 5 min de estimulación con factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor*, EGF, 10 ng/mL), las células se lavaron con PBS y se lisaron con tampón de lisis frío. Los lisados obtenidos se centrifugaron a 16000g durante 15 min y se determinó la concentración de proteína usando el método del ácido bicinchonínico (Thermo Scientific). De cada lisado resultante se separaron 50 µL para analizar la expresión total de Ras y el volumen restante se incubó con la proteína glutatión S-transferasa fusionada al dominio de unión a Ras (*Ras binding domain*, RBD) de Raf1 unida a una resina de agarosa-glutatión, lo que permite separar la proteína Ras activa. Las muestras se hirvieron durante 5 min y se cargaron en geles de poliacrilamida (4-20%, SDS-PAGE, Bio-Rad) para su análisis mediante electroforesis. Las proteínas Ras se visualizaron mediante transferencia en membranas de nitrocelulosa seguido de inmunodetección usando el anticuerpo primario anti-Ras de ratón (Thermo Scientific) y el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa. Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia en un revelador Fujifilm LAS-3000 (Tokio, Japón). Las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH). Los datos corresponden a cuatro experimentos

independientes y se representan en gráficos de barras como la media \pm desviación estándar.

4.5.4. Visualización progerina

Se sembraron células AF3 con la mutación $Lmna^{G609G/G609G}$ a una densidad de 2×10^4 células/pocillo sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro previamente tratados con hidrobromuro de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 24 h a 37 °C y con un 5% de CO₂ en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS. Trascurrido este tiempo, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco con una concentración 25 μ M del compuesto **UCM13239** o DMSO y las células se incubaron durante 48 h. Las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con una disolución de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) y se permeabilizaron con PBS-T (PBS con 0.1% de Triton X-100, Sigma-Aldrich). La incubación con el anticuerpo primario anti-lámina A de cabra (1:100, Santa Cruz Biotechnology) en PBS con un 4% de suero normal de burro (*normal donkey serum*, NDS) se llevó a cabo a temperatura ambiente y con agitación suave durante 2 h. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS-T y se incubaron durante 1 h más en ausencia de luz con el anticuerpo Alexa Fluor 647 *donkey anti-goat* (1:1500, Thermo Scientific) diluido en PBS con un 1% de NDS. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS-T y se incubaron con Hoechst 33258 (5 μ g/mL, Sigma-Aldrich) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente para visualizar los núcleos celulares. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS-T y los cubreobjetos se montaron cuidadosamente con Immumount (Thermo Scientific) sobre portaobjetos. La visualización se llevó a cabo usando un microscopio confocal invertido Olympus IX83 provisto de un objetivo 60X *oil immersion* y los filtros adecuados de excitación y emisión. Las imágenes mostradas son representativas de entre 3 y 5 experimentos independientes.

4.5.5. Análisis mediante inmunodetección de los niveles de p-AKT

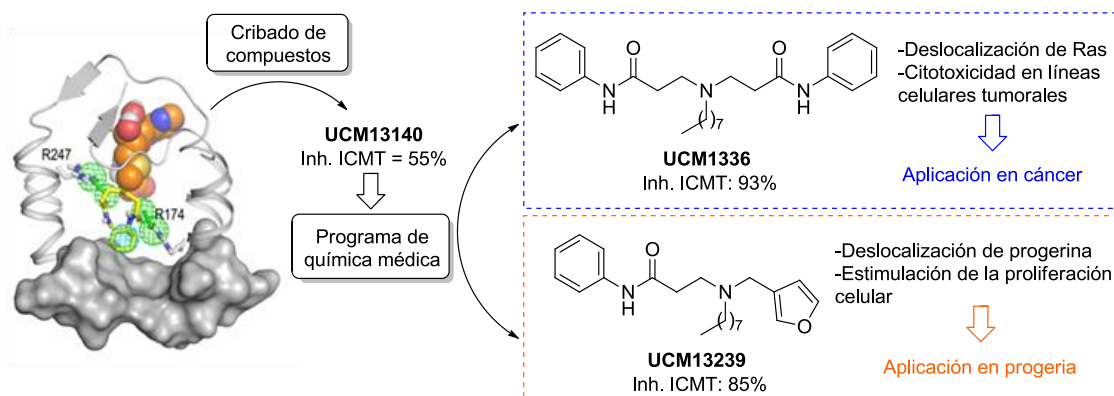
Se sembraron 2×10^6 células AF3 con de la mutación $Lmna^{G609G/G609G}$ y se incubaron durante 24 h en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, hasta conseguir un 80% de confluencia. A continuación, se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco con una concentración 25 μ M del compuesto **UCM13239** o el volumen equivalente de DMSO, y las células se incubaron durante toda la noche. Tras estimulación durante 5 min con EGF (10 ng/mL), las células se lavaron con PBS y se lisaron con tampón RIPA frío (50

mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Igepal) provisto de un cocktail de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche y Sigma-Aldrich, respectivamente). Los lisados se centrifugaron a 16000g durante 10 min a 4 °C y se usaron inmediatamente o se almacenaron a -80 °C hasta su empleo. Se determinó la concentración de proteína (DC Protein Assay Kit, Bio-Rad) y muestras con igual cantidad total de proteína se diluyeron en tampón Laemmli reductor (Bio-Rad) y se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min. Las muestras se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (4-20% SDS-PAGE, Bio-Rad) y las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Amersham). Tras 1 h de incubación en tampón de bloqueo [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 (TBS-T) con 1% de BSA], las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios *rabbit anti-phospho-AKT* y *rabbit anti-AKT* (1:1000, Cell Signalling). A continuación, las membranas se lavaron tres veces (durante 5 min cada una) con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario *goat anti-rabbit* conjugado con peroxidasa (1:5000, Sigma-Aldrich) durante 1 h a temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia en un revelador Fujifilm LAS-3000 (Tokio, Japón) y las bandas se cuantificaron por densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH). Los datos representados en el diagrama de barras corresponden a la media \pm DE de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación resaltan la importancia de la inhibición de la enzima ICMT como una aproximación novedosa en el desarrollo de fármacos efectivos para combatir el cáncer y la progeria, y permiten la validación de esta enzima como diana terapéutica para el tratamiento de estas enfermedades. Así, la elaboración de un modelo de farmacóforo basado en la estructura y el posterior cribado de los compuestos que forman parte de la quimioteca de nuestro laboratorio, han posibilitado la identificación de un *hit* (**UCM13140**) en la búsqueda de nuevos inhibidores de la enzima ICMT. Los estudios de relación estructura-actividad han permitido caracterizar una serie de inhibidores de la enzima ICMT entre los que destacan los compuestos **UCM1336** y **UCM13239**, los cuales son capaces de bloquear el 93% y el 85% de la actividad de la enzima ICMT a una concentración 50 μM , respectivamente. Por una parte, la excelente capacidad del compuesto **UCM1336** para deslocalizar Ras de la membrana plasmática, unido a su carácter citotóxico en varias líneas tumorales, permiten considerarlo un candidato que puede ser utilizado en modelos *in vivo* de tumores dependientes de Ras. Por otra parte, la eficacia del derivado **UCM13239** para reducir los niveles de progerina en la membrana nuclear interna junto con su capacidad para inducir la proliferación de los fibroblastos progeroides, hacen de este compuesto un excelente punto de partida para el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de la progeria. En ambos casos, estos estudios continúan llevándose a cabo en nuestro laboratorio.



BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Coleman, M. L.; Marshall, C. J.; Olson, M. F. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 355-366.
2. Dechat, T.; Pflieger, K.; Sengupta, K.; Shimi, T.; Shumaker, D. K.; Solimando, L.; Goldman, R. D. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* **2008**, *22*, 832-853.
3. Vogelstein, B.; Papadopoulos, N.; Velculescu, V. E.; Zhou, S.; Diaz, L. A., Jr.; Kinzler, K. W. Cancer genome landscapes. *Science* **2013**, *339*, 1546-1558.
4. Cox, A. D.; Fesik, S. W.; Kimmelman, A. C.; Luo, J.; Der, C. J. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 828-851.
5. De Sandre-Giovannoli, A.; Bernard, R.; Cau, P.; Navarro, C.; Amiel, J.; Boccaccio, I.; Lyonnet, S.; Stewart, C. L.; Munnich, A.; Le Merrer, M.; Levy, N. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* **2003**, *300*, 2055.
6. Eriksson, M.; Brown, W. T.; Gordon, L. B.; Glynn, M. W.; Singer, J.; Scott, L.; Erdos, M. R.; Robbins, C. M.; Moses, T. Y.; Berglund, P.; Dutra, A.; Pak, E.; Durkin, S.; Csoka, A. B.; Boehnke, M.; Glover, T. W.; Collins, F. S. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **2003**, *423*, 293-298.
7. Wright, L. P.; Philips, M. R. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 883-891.
8. Ahearn, I. M.; Haigis, K.; Bar-Sagi, D.; Philips, M. R. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 39-51.
9. Baek, J.-H.; McKenna, T.; Eriksson, M. *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*. In *Genetic Disorders*; Puiu, M. Ed; CC BY 3.0, **2013**, pp 65-87.
10. Chang, S. Y.; Hudon-Miller, S. E.; Yang, S. H.; Jung, H. J.; Lee, J. M.; Farber, E.; Subramanian, T.; Andres, D. A.; Spielmann, H. P.; Hrycyna, C. A.; Young, S. G.; Fong, L. G. Inhibitors of protein geranylgeranyltransferase-I lead to prelamin A accumulation in cells by inhibiting ZMPSTE24. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 1176-1182.

Bibliografía

11. Michaelson, D.; Ali, W.; Chiu, V. K.; Bergo, M.; Silletti, J.; Wright, L.; Young, S. G.; Philips, M. Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 1606-1616.
12. Ghomashchi, F.; Zhang, X.; Liu, L.; Gelb, M. H. Binding of prenylated and polybasic peptides to membranes: affinities and intervesicle exchange. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11910-11918.
13. Casey, P. J.; Seabra, M. C. Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 5289-5292.
14. Dalton, M. B.; Fantle, K. S.; Bechtold, H. A.; DeMaio, L.; Evans, R. M.; Krystosek, A.; Sinensky, M. The farnesyl protein transferase inhibitor BZA-5B blocks farnesylation of nuclear lamins and p21ras but does not affect their function or localization. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 3295-3304.
15. Dalton, M.; Sinensky, M. Expression systems for nuclear lamin proteins: farnesylation in assembly of nuclear lamina. *Methods Enzymol.* **1995**, *250*, 134-148.
16. Jang, G. F.; Gelb, M. H. Substrate specificity of mammalian prenyl protein-specific endoprotease activity. *Biochemistry* **1998**, *37*, 4473-4481.
17. Boyartchuk, V. L.; Ashby, M. N.; Rine, J. Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science* **1997**, *275*, 1796-1800.
18. Barrowman, J.; Hamblet, C.; George, C. M.; Michaelis, S. Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CAAX processing compartment. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 5398-5408.
19. Quigley, A.; Dong, Y. Y.; Pike, A. C.; Dong, L.; Shrestha, L.; Berridge, G.; Stansfeld, P. J.; Sansom, M. S.; Edwards, A. M.; Bountra, C.; von Delft, F.; Bullock, A. N.; Burgess-Brown, N. A.; Carpenter, E. P. The structural basis of ZMPSTE24-dependent laminopathies. *Science* **2013**, *339*, 1604-1607.
20. Clarke, S.; Vogel, J. P.; Deschenes, R. J.; Stock, J. Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4643-4647.
21. Dai, Q.; Choy, E.; Chiu, V.; Romano, J.; Slivka, S. R.; Steitz, S. A.; Michaelis, S.; Philips, M. R. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15030-15034.
22. Xie, H.; Yamane, H. K.; Stephenson, R. C.; Ong, O. C.; Fung, B. K.-K.; Clarke, S. Analysis of prenylated carboxyl-terminal cysteine methyl esters in proteins. *Methods* **1990**, *1*, 276-282.
23. Ashby, M. N. CAAX converting enzymes. *Curr. Opin. Lipidol.* **1998**, *9*, 99-102.
24. Barrowman, J.; Michaelis, S. ZMPSTE24, an integral membrane zinc metalloprotease with a connection to progeroid disorders. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 761-773.

25. Corrigan, D. P.; Kuszczak, D.; Rusinol, A. E.; Thewke, D. P.; Hrycyna, C. A.; Michaelis, S.; Sinensky, M. S. Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant ZMPSTE24. *Biochem. J.* **2005**, *387*, 129-138.
26. Young, S. G.; Fong, L. G.; Michaelis, S. Prelamin A, ZMPSTE24, misshapen cell nuclei, and progeria--new evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis. *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 2531-2558.
27. Pendas, A. M.; Zhou, Z.; Cadinanos, J.; Freije, J. M.; Wang, J.; Hultenby, K.; Astudillo, A.; Wernerson, A.; Rodriguez, F.; Tryggvason, K.; Lopez-Otin, C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in ZMPSTE24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat. Genet.* **2002**, *31*, 94-99.
28. Leung, G. K.; Schmidt, W. K.; Bergo, M. O.; Gavino, B.; Wong, D. H.; Tam, A.; Ashby, M. N.; Michaelis, S.; Young, S. G. Biochemical studies of ZMPSTE24-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29051-29058.
29. Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **2001**, *294*, 1299-1304.
30. Upadhyaya, P.; Qian, Z.; Selner, N. G.; Clippinger, S. R.; Wu, Z.; Briesewitz, R.; Pei, D. Inhibition of Ras signaling by blocking Ras-effector interactions with cyclic peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54*, 7602-7606.
31. Taveras, A. G.; Remiszewski, S. W.; Doll, R. J.; Cesarz, D.; Huang, E. C.; Kirschmeier, P.; Pramanik, B. N.; Snow, M. E.; Wang, Y. S.; del Rosario, J. D.; Vibulbhan, B.; Bauer, B. B.; Brown, J. E.; Carr, D.; Catino, J.; Evans, C. A.; Girijavallabhan, V.; Heimark, L.; James, L.; Liberles, S.; Nash, C.; Perkins, L.; Senior, M. M.; Tsarbopoulos, A.; Webber, S. E.; et al. Ras oncoprotein inhibitors: the discovery of potent, Ras nucleotide exchange inhibitors and the structural determination of a drug-protein complex. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 125-133.
32. Herrmann, C.; Block, C.; Geisen, C.; Haas, K.; Weber, C.; Winde, G.; Moroy, T.; Muller, O. Sulindac sulfide inhibits Ras signaling. *Oncogene* **1998**, *17*, 1769-1776.
33. Bos, J. L.; Rehmann, H.; Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **2007**, *129*, 865-877.
34. Maurer, T.; Garrenton, L. S.; Oh, A.; Pitts, K.; Anderson, D. J.; Skelton, N. J.; Fauber, B. P.; Pan, B.; Malek, S.; Stokoe, D.; Ludlam, M. J.; Bowman, K. K.; Wu, J.; Giannetti, A. M.; Starovasnik, M. A.; Mellman, I.; Jackson, P. K.; Rudolph, J.; Wang, W.; Fang, G. Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5299-5304.
35. Sun, Q.; Burke, J. P.; Phan, J.; Burns, M. C.; Olejniczak, E. T.; Waterson, A. G.; Lee, T.; Rossanese, O. W.; Fesik, S. W. Discovery of small molecules that bind to K-Ras and inhibit SOS-mediated activation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 6140-6143.

36. Peri, F.; Airoidi, C.; Colombo, S.; Martegani, E.; van Neuren, A. S.; Stein, M.; Marinzi, C.; Nicotra, F. Design, synthesis and biological evaluation of sugar-derived Ras inhibitors. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1839-1848.
37. Yang, M. H.; Nickerson, S.; Kim, E. T.; Liot, C.; Laurent, G.; Spang, R.; Philips, M. R.; Shan, Y.; Shaw, D. E.; Bar-Sagi, D.; Haigis, M. C.; Haigis, K. M. Regulation of RAS oncogenicity by acetylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 10843-10848.
38. Waldmann, H.; Karaguni, I. M.; Carpintero, M.; Gourzoulidou, E.; Herrmann, C.; Brockmann, C.; Oschkinat, H.; Muller, O. Sulindac-derived Ras pathway inhibitors target the Ras-Raf interaction and downstream effectors in the Ras pathway. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 454-458.
39. Kato-Stankiewicz, J.; Hakimi, I.; Zhi, G.; Zhang, J.; Serebriiskii, I.; Guo, L.; Edamatsu, H.; Koide, H.; Menon, S.; Eckl, R.; Sakamuri, S.; Lu, Y.; Chen, Q. Z.; Agarwal, S.; Baumbach, W. R.; Golemis, E. A.; Tamanoi, F.; Khazak, V. Inhibitors of Ras/Raf-1 interaction identified by two-hybrid screening revert Ras-dependent transformation phenotypes in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14398-14403.
40. Shima, F.; Yoshikawa, Y.; Ye, M.; Araki, M.; Matsumoto, S.; Liao, J.; Hu, L.; Sugimoto, T.; Ijiri, Y.; Takeda, A.; Nishiyama, Y.; Sato, C.; Muraoka, S.; Tamura, A.; Osoda, T.; Tsuda, K.; Miyakawa, T.; Fukunishi, H.; Shimada, J.; Kumasaka, T.; Yamamoto, M.; Kataoka, T. In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8182-8187.
41. Ostrem, J. M.; Peters, U.; Sos, M. L.; Wells, J. A.; Shokat, K. M. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* **2013**, *503*, 548-551.
42. Lito, P.; Solomon, M.; Li, L. S.; Hansen, R.; Rosen, N. Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science* **2016**.
43. Schafer, W. R.; Kim, R.; Sterne, R.; Thorner, J.; Kim, S. H.; Rine, J. Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of yeast and humans. *Science* **1989**, *245*, 379-385.
44. Basso, A. D.; Kirschmeier, P.; Bishop, W. R. Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 15-31.
45. Berndt, N.; Hamilton, A. D.; Sebt, S. M. Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 775-791.
46. Karp, J. E.; Kaufmann, S. H.; Adjei, A. A.; Lancet, J. E.; Wright, J. J.; End, D. W. Current status of clinical trials of farnesyltransferase inhibitors. *Curr. Opin. Oncol.* **2001**, *13*, 470-476.
47. Doll, R. J.; Kirschmeier, P.; Bishop, W. R. Farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents: critical crossroads. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2004**, *7*, 478-486.

48. Mazieres, J.; Pradines, A.; Favre, G. Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett.* **2004**, *206*, 159-167.
49. Downward, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11-22.
50. Whyte, D. B.; Kirschmeier, P.; Hockenberry, T. N.; Nunez-Oliva, I.; James, L.; Catino, J. J.; Bishop, W. R.; Pai, J. K. K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 14459-14464.
51. Ochocki, J. D.; Distefano, M. D. Prenyltransferase inhibitors: treating human ailments from cancer to parasitic infections. *MedChemComm* **2013**, *4*, 476-492.
52. Craig, K. S.; Williams, D. R.; Hollander, I.; Frommer, E.; Mallon, R.; Collins, K.; Wojciechowicz, D.; Tahir, A.; Van Soest, R.; Andersen, R. J. Novel sesterterpenoid and norseseterterpenoid Rce-protease inhibitors isolated from the marine sponge *Hippospongia* sp. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4801-4804.
53. Williams, D. E.; Hollander, I.; Feldberg, L.; Frommer, E.; Mallon, R.; Tahir, A.; van Soest, R.; Andersen, R. J. Scalarane-based sesterterpenoid Rce-protease inhibitors isolated from the Indonesian marine sponge *Carteriospongia foliascens*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1106-1109.
54. Manandhar, S. P.; Hildebrandt, E. R.; Schmidt, W. K. Small-molecule inhibitors of the Rce1p CAAX protease. *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12*, 983-993.
55. Shoichet, B. K. Interpreting steep dose-response curves in early inhibitor discovery. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7274-7277.
56. Bergo, M. O.; Wahlstrom, A. M.; Fong, L. G.; Young, S. G. Genetic analyses of the role of Rce1 in Ras membrane association and transformation. *Methods Enzymol.* **2008**, *438*, 367-389.
57. Bergo, M. O.; Lieu, H. D.; Gavino, B. J.; Ambroziak, P.; Otto, J. C.; Casey, P. J.; Walker, Q. M.; Young, S. G. On the physiological importance of endoproteolysis of CAAX proteins: heart-specific Rce1 knockout mice develop a lethal cardiomyopathy. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4729-4736.
58. Wahlstrom, A. M.; Cutts, B. A.; Karlsson, C.; Andersson, K. M.; Liu, M.; Sjogren, A. K.; Swolin, B.; Young, S. G.; Bergo, M. O. Rce1 deficiency accelerates the development of K-Ras-induced myeloproliferative disease. *Blood* **2007**, *109*, 763-768.
59. Wahlstrom, A. M.; Cutts, B. A.; Liu, M.; Lindskog, A.; Karlsson, C.; Sjogren, A. K.; Andersson, K. M.; Young, S. G.; Bergo, M. O. Inactivating Icmt ameliorates K-Ras-induced myeloproliferative disease. *Blood* **2008**, *112*, 1357-1365.

60. Winter-Vann, A. M.; Kamen, B. A.; Bergo, M. O.; Young, S. G.; Melnyk, S.; James, S. J.; Casey, P. J. Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: an unexpected property of methotrexate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 6529-6534.
61. Konstantinopoulos, P. A.; Karamouzis, M. V.; Papavassiliou, A. G. Post-translational modifications and regulation of the Ras superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 541-555.
62. Chiang, P. K.; Gordon, R. K.; Tal, J.; Zeng, G. C.; Doctor, B. P.; Pardhasaradhi, K.; McCann, P. P. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* **1996**, *10*, 471-480.
63. Donelson, J. L.; Hodges-Loaiza, H. B.; Henriksen, B. S.; Hrycyna, C. A.; Gibbs, R. A. Solid-phase synthesis of prenylcysteine analogs. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2975-2981.
64. Majmudar, J. D.; Hodges-Loaiza, H. B.; Hahne, K.; Donelson, J. L.; Song, J.; Shrestha, L.; Harrison, M. L.; Hrycyna, C. A.; Gibbs, R. A. Amide-modified prenylcysteine based Icmt inhibitors: Structure-activity relationships, kinetic analysis and cellular characterization. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 283-295.
65. Bergman, J. A.; Hahne, K.; Song, J.; Hrycyna, C. A.; Gibbs, R. A. S-Farnesyl-thiopropionic acid (FTPA) triazoles as potent inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 15-19.
66. Majmudar, J. D.; Hahne, K.; Hrycyna, C. A.; Gibbs, R. A. Probing the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Icmt) binding pocket: sulfonamide modified farnesyl cysteine (SMFC) analogs as Icmt inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2616-2620.
67. Bergman, J. A.; Hahne, K.; Hrycyna, C. A.; Gibbs, R. A. Lipid and sulfur substituted prenylcysteine analogs as human Icmt inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5616-5619.
68. Majmudar, J. D.; Morrison-Logue, A.; Song, J.; Hrycyna, C. A.; Gibbs, R. A. Identification of a novel nanomolar inhibitor of hlcmt *via* a carboxylate replacement approach. *MedChemComm* **2012**, *3*, 1125-1137.
69. Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Fechner, G. A.; Boyle, A.; Simpson, M. M.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N.; Su, N.; Chen, H.; Quinn, R. J. Spermatinamine, the first natural product inhibitor of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase, a new cancer target. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6860-6863.
70. Buchanan, M. S.; Carroll, A. R.; Fechner, G. A.; Boyle, A.; Simpson, M.; Addepalli, R.; Avery, V. M.; Hooper, J. N.; Cheung, T.; Chen, H.; Quinn, R. J. Aplysamine 6, an alkaloidal inhibitor of Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase from the sponge *Pseudoceratina* sp. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1066-1067.
71. Winter-Vann, A. M.; Baron, R. A.; Wong, W.; dela Cruz, J.; York, J. D.; Gooden, D. M.; Bergo, M. O.; Young, S. G.; Toone, E. J.; Casey, P. J. A small-molecule inhibitor of isoprenylcysteine

- carboxyl methyltransferase with antitumor activity in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4336-4341.
72. Casey, P. J.; Baron, R. A.; Winter-Vann, A. M. Indole derivative inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase. WO2006102126A2. **2006**.
73. Wang, M.; Tan, W.; Zhou, J.; Leow, J.; Go, M.; Lee, H. S.; Casey, P. J. A small molecule inhibitor of isoprenylcysteine carboxymethyltransferase induces autophagic cell death in PC3 prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 18678-18684.
74. Go, M. L.; Leow, J. L.; Gorla, S. K.; Schuller, A. P.; Wang, M.; Casey, P. J. Amino derivatives of indole as potent inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6838-6850.
75. Bhadoriya, K. S.; Sharma, M. C.; Jain, S. V. Pharmacophore modeling and atom-based 3D-QSAR studies on amino derivatives of indole as potent isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Icmt) inhibitors. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1081*, 466-476.
76. Ramanujulu, P. M.; Yang, T.; Yap, S. Q.; Wong, F. C.; Casey, P. J.; Wang, M.; Go, M. L. Functionalized indoleamines as potent, drug-like inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Icmt). *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 378-386.
77. Ramanujulu, P. M.; Yang, T.; Casey, M.-W.; Casey, P. J.; Go, M. L. Preparation of 1,3,5-substituted indole as ICMT inhibitors useful in the treatment of cancer. WO2013180656A1. **2013**.
78. Lau, H. Y.; Ramanujulu, P. M.; Guo, D.; Yang, T.; Wirawan, M.; Casey, P. J.; Go, M. L.; Wang, M. An improved isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase inhibitor induces cancer cell death and attenuates tumor growth in vivo. *Cancer Biol. Ther.* **2014**, *15*, 1280-1291.
79. Judd, W. R.; Slattum, P. M.; Hoang, K. C.; Bhoite, L.; Valppu, L.; Alberts, G.; Brown, B.; Roth, B.; Ostanin, K.; Huang, L.; Wettstein, D.; Richards, B.; Willardsen, J. A. Discovery and SAR of methylated tetrahydropyranyl derivatives as inhibitors of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5031-5047.
80. Stevenson, G. I.; Garavelas, A.; Cosgrove, K. L.; Reynolds, K. A.; Franken, N. C.; Whittell, L. R.; Wijesekera, H. P. Preparation of tetrahydropyranylethylpyrazinamine derivatives and analogs for use as isoprenylcysteinecarboxymethyl transferase inhibitors. WO2014041349A1 **2014**.
81. Hutchinson, J. Congenital absence of hair and mammary glands with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six. *Med. Chir. Trans.* **1886**, *69*, 473-477.
82. Gilford, H. On a condition of mixed premature and immature development. *Med. Chir. Trans.* **1897**, *80*, 17-46 25.

83. Merideth, M. A.; Gordon, L. B.; Clauss, S.; Sachdev, V.; Smith, A. C.; Perry, M. B.; Brewer, C. C.; Zalewski, C.; Kim, H. J.; Solomon, B.; Brooks, B. P.; Gerber, L. H.; Turner, M. L.; Domingo, D. L.; Hart, T. C.; Graf, J.; Reynolds, J. C.; Gropman, A.; Yanovski, J. A.; Gerhard-Herman, M.; Collins, F. S.; Nabel, E. G.; Cannon, R. O., 3rd; Gahl, W. A.; Introne, W. J. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 592-604.
84. Kieran, M. W.; Gordon, L.; Kleinman, M. New approaches to progeria. *Pediatrics* **2007**, *120*, 834-841.
85. Domingo, D. L.; Trujillo, M. I.; Council, S. E.; Merideth, M. A.; Gordon, L. B.; Wu, T.; Introne, W. J.; Gahl, W. A.; Hart, T. C. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: oral and craniofacial phenotypes. *Oral Dis.* **2009**, *15*, 187-195.
86. Cleveland, R. H.; Gordon, L. B.; Kleinman, M. E.; Miller, D. T.; Gordon, C. M.; Snyder, B. D.; Nazarian, A.; Giobbie-Hurder, A.; Neuberg, D.; Kieran, M. W. A prospective study of radiographic manifestations in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Pediatr. Radiol.* **2012**, *42*, 1089-1098.
87. Bertrand, A. T.; Chikhaoui, K.; Yaou, R. B.; Bonne, G. Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem. Soc. Trans.* **2011**, *39*, 1687-1692.
88. Capell, B. C.; Collins, F. S. Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 940-952.
89. Goldman, R. D.; Gruenbaum, Y.; Moir, R. D.; Shumaker, D. K.; Spann, T. P. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 533-547.
90. Gruenbaum, Y.; Margalit, A.; Goldman, R. D.; Shumaker, D. K.; Wilson, K. L. The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 21-31.
91. Haithcock, E.; Dayani, Y.; Neufeld, E.; Zahand, A. J.; Feinstein, N.; Mattout, A.; Gruenbaum, Y.; Liu, J. Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16690-16695.
92. Scaffidi, P.; Misteli, T. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* **2006**, *312*, 1059-1063.
93. Dechat, T.; Shimi, T.; Adam, S. A.; Rusinol, A. E.; Andres, D. A.; Spielmann, H. P.; Sinensky, M. S.; Goldman, R. D. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4955-4960.
94. Goldman, R. D.; Shumaker, D. K.; Erdos, M. R.; Eriksson, M.; Goldman, A. E.; Gordon, L. B.; Gruenbaum, Y.; Khuon, S.; Mendez, M.; Varga, R.; Collins, F. S. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8963-8968.

95. Scaffidi, P.; Misteli, T. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 440-445.
96. Gordon, L. B.; Rothman, F. G.; Lopez-Otin, C.; Misteli, T. Progeria: a paradigm for translational medicine. *Cell* **2014**, *156*, 400-407.
97. Halaschek-Wiener, J.; Brooks-Wilson, A. Progeria of stem cells: stem cell exhaustion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **2007**, *62*, 3-8.
98. Wenzel, V.; Roedl, D.; Gabriel, D.; Gordon, L. B.; Herlyn, M.; Schneider, R.; Ring, J.; Djabali, K. Naive adult stem cells from patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome express low levels of progerin in vivo. *Biol. Open* **2012**, *1*, 516-526.
99. Scaffidi, P.; Misteli, T. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 452-459.
100. Espada, J.; Varela, I.; Flores, I.; Ugalde, A. P.; Cadinanos, J.; Pendas, A. M.; Stewart, C. L.; Tryggvason, K.; Blasco, M. A.; Freije, J. M.; Lopez-Otin, C. Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J. Cell Biol.* **2008**, *181*, 27-35.
101. Zhang, J.; Lian, Q.; Zhu, G.; Zhou, F.; Sui, L.; Tan, C.; Mutalif, R. A.; Navasankari, R.; Zhang, Y.; Tse, H. F.; Stewart, C. L.; Colman, A. A human iPSC model of Hutchinson Gilford progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 31-45.
102. Liu, G. H.; Suzuki, K.; Qu, J.; Sancho-Martinez, I.; Yi, F.; Li, M.; Kumar, S.; Nivet, E.; Kim, J.; Soligalla, R. D.; Dubova, I.; Goebel, A.; Plongthongkum, N.; Fung, H. L.; Zhang, K.; Loring, J. F.; Laurent, L. C.; Izpisua Belmonte, J. C. Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 688-694.
103. Osorio, F. G.; Navarro, C. L.; Cadinanos, J.; Lopez-Mejia, I. C.; Quiros, P. M.; Bartoli, C.; Rivera, J.; Tazi, J.; Guzman, G.; Varela, I.; Depetris, D.; de Carlos, F.; Cobo, J.; Andres, V.; De Sandre-Giovannoli, A.; Freije, J. M.; Levy, N.; Lopez-Otin, C. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 106ra107.
104. Huang, S.; Chen, L.; Libina, N.; Janes, J.; Martin, G. M.; Campisi, J.; Oshima, J. Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford progeria cells by RNA interference. *Hum. Genet.* **2005**, *118*, 444-450.
105. Kole, R.; Collins, F. S.; Erdos, M. R.; Cao, K. Methods for treating progeroid laminopathies using oligonucleotide analogues targeting human LMNA. WO2013/086444A2. **2013**.
106. Verstraeten, V. L.; Peckham, L. A.; Olive, M.; Capell, B. C.; Collins, F. S.; Nabel, E. G.; Young, S. G.; Fong, L. G.; Lammerding, J. Protein farnesylation inhibitors cause donut-shaped cell nuclei attributable to a centrosome separation defect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4997-5002.

107. Gordon, L. B.; Kleinman, M. E.; Miller, D. T.; Neuberg, D. S.; Giobbie-Hurder, A.; Gerhard-Herman, M.; Smoot, L. B.; Gordon, C. M.; Cleveland, R.; Snyder, B. D.; Fligor, B.; Bishop, W. R.; Statkevich, P.; Regen, A.; Sonis, A.; Riley, S.; Ploski, C.; Correia, A.; Quinn, N.; Ullrich, N. J.; Nazarian, A.; Liang, M. G.; Huh, S. Y.; Schwartzman, A.; Kieran, M. W. Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16666-16671.
108. Boston, C. s. H. Study of zoledronic acid, pravastatin and lonafarnib for patients with progeria. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT00916747>
109. Coffinier, C.; Hudon, S. E.; Farber, E. A.; Chang, S. Y.; Hrycyna, C. A.; Young, S. G.; Fong, L. G. HIV protease inhibitors block the zinc metalloproteinase ZMPSTE24 and lead to an accumulation of prelamin A in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13432-13437.
110. Marino, G.; Ugalde, A. P.; Salvador-Montoliu, N.; Varela, I.; Quiros, P. M.; Cadinanos, J.; van der Pluijm, I.; Freije, J. M.; Lopez-Otin, C. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum. Mol. Genet.* **2008**, *17*, 2196-2211.
111. Goulbourne, C. N.; Vaux, D. J. HIV protease inhibitors inhibit FACE1/ZMPSTE24: a mechanism for acquired lipodystrophy in patients on highly active antiretroviral therapy? *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 292-296.
112. Gentry, L. R.; Nishimura, A.; Cox, A. D.; Martin, T. D.; Tsygankov, D.; Nishida, M.; Elston, T. C.; Der, C. J. Divergent roles of CAAX motif-signaled posttranslational modifications in the regulation and subcellular localization of Ral GTPases. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 22851-22861.
113. Ibrahim, M. X.; Sayin, V. I.; Akula, M. K.; Liu, M.; Fong, L. G.; Young, S. G.; Bergo, M. O. Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science* **2013**, *340*, 1330-1333.
114. Romano, J. D.; Michaelis, S. Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Ste14p, founding member of the isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase family. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 1957-1971.
115. Wright, L. P.; Court, H.; Mor, A.; Ahearn, I. M.; Casey, P. J.; Philips, M. R. Topology of mammalian isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase determined in live cells with a fluorescent probe. *Mol. Cell Biol.* **2009**, *29*, 1826-1833.
116. Diver, M. M.; Long, S. B. Mutational analysis of the integral membrane methyltransferase isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT) reveals potential substrate binding sites. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26007-26020.
117. Yang, J.; Kulkarni, K.; Manolaridis, I.; Zhang, Z.; Dodd, R. B.; Mas-Droux, C.; Barford, D. Mechanism of isoprenylcysteine carboxyl methylation from the crystal structure of the integral membrane methyltransferase ICMT. *Mol. Cell* **2011**, *44*, 997-1004.

118. *Dyscovery Studio*, version 3.5; Accelry Inc.: San Diego, CA, USA, **2012**.
119. Baron, R. A.; Casey, P. J. Analysis of the kinetic mechanism of recombinant human isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase (Icmt). *BMC Biochem.* **2004**, *5*, 19.
120. Lopez-Rodriguez, M. L.; Ortega-Gutierrez, S.; Martin-Fontecha Corrales, M.; Balabasquer, M.; Ortega, F. J.; Marin-Ramos, N. I. Novel inhibitors of the enzyme isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT). WO2014118418A1. **2014**.
121. <http://www.uniprot.org/uniprot/O60725>
122. Marti-Renom, M. A.; Stuart, A. C.; Fiser, A.; Sanchez, R.; Melo, F.; Sali, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 291-325.
123. Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, *4*, 435-447.
124. Cordomi, A.; Caltabiano, G.; Pardo, L. Membrane protein simulations using AMBER force field and berger lipid parameters. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 948-958.
125. Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* **2003**, *52*, 609-623.
126. Brown, M. J.; Milano, P. D.; Lever, D. C.; Epstein, W. W.; Poulter, C. D. Prenylated proteins. A convenient synthesis of farnesyl cysteinyl thioethers. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3176-3177.
127. Donelson, J. L.; Hodges, H. B.; Macdougall, D. D.; Henriksen, B. S.; Hrycyna, C. A.; Gibbs, R. A. Amide-substituted farnesylcysteine analogs as inhibitors of human isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4420-4423.
128. Cvetovich, R. J.; DiMichele, L. Formation of acrylanilides, acrylamides, and amides directly from carboxylic acids using thionyl chloride in dimethylacetamide in the absence of bases. *Org. Process Res. Dev.* **2006**, *10*, 944-946.
129. Honigberg, I.; Hartung, W. Adducts with N-substituted acrylamides. *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 1822-1824.
130. Eriksson, J.; Åberg, O.; Långström, B. Synthesis of [11C]/[13C]acrylamides by palladium-mediated carbonylation. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007*, 455-461.
131. Pasquinucci, L.; Prezzavento, O.; Marrazzo, A.; Amata, E.; Ronsisvalle, S.; Georgoussi, Z.; Fourla, D. D.; Scoto, G. M.; Parenti, C.; Arico, G.; Ronsisvalle, G. Evaluation of N-substitution in 6,7-benzomorphan compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4975-4982.

132. de Greef, T. F. A.; Nieuwenhuizen, M. M. L.; Sijbesma, R. P.; Meijer, E. W. Competitive intramolecular hydrogen bonding in oligo(ethylene oxide) substituted quadruple hydrogen bonded systems. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 598-610.
133. Jadhav, G. P.; Chhabra, S. R.; Telford, G.; Hooi, D. S.; Righetti, K.; Williams, P.; Kellam, B.; Pritchard, D. I.; Fischer, P. M. Immunosuppressive but non-LasR-inducing analogues of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3348-3359.
134. Hutchins, R. O.; Adams, J.; Rutledge, M. C. Stereoselective hydride reductions of cyclic N-diphenylphosphinyl imines. highly diastereoselective syntheses of protected primary amines. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7396-7405.
135. Fujioka, H.; Yamamoto, H.; Miyazaki, M.; Yamanaka, T.; Takuma, K.; Kita, Y. Reductive Beckmann fragmentation of α -alkoxycycloalkanone oxime acetates. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5367-5368.
136. Kroth, H.; Hamel, C.; Benderitter, P.; Froestl, W.; Sreenivasachary, N.; Muhs, A. Novel compounds for the treatment of diseases associated with amyloid or amyloid-like proteins. WO2011128455A1 **2011**.
137. Sunada, Y.; Kawakami, H.; Imaoka, T.; Motoyama, Y.; Nagashima, H. Hydrosilane reduction of tertiary carboxamides by iron carbonyl catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9511-9514.
138. Shields, C. J.; Falvey, D. E.; Schuster, G. B.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E. Competitive singlet-singlet energy transfer and electron transfer activation of aryl azides: application to photocross-linking experiments. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3501-3507.
139. Cee, V. J.; Volak, L. P.; Chen, Y.; Bartberger, M. D.; Tegley, C.; Arvedson, T.; McCarter, J.; Tasker, A. S.; Fotsch, C. Systematic study of the Glutathione (GSH) reactivity of N-arylacrylamides: 1. Effects of aryl substitution. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9171-9178.
140. Kokosza, K.; Balzarini, J.; Piotrowska, D. G. Design, synthesis, antiviral and cytostatic evaluation of novel isoxazolidine nucleotide analogues with a carbamoyl linker. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1097-1108.
141. Prime, M. E.; Andersen, O. A.; Barker, J. J.; Brooks, M. A.; Cheng, R. K. Y.; Toogood-Johnson, I.; Courtney, S. M.; Brookfield, F. A.; Yarnold, C. J.; Marston, R. W.; Johnson, P. D.; Johnsen, S. F.; Palfrey, J. J.; Vaidya, D.; Erfan, S.; Ichihara, O.; Felicetti, B.; Palan, S.; Pedret-Dunn, A.; Schaertl, S.; Sternberger, I.; Ebneith, A.; Scheel, A.; Winkler, D.; Toledo-Sherman, L.; Beconi, M.; Macdonald, D.; Muñoz-Sanjuan, I.; Dominguez, C.; Wityak, J. Discovery and Structure-Activity Relationship of Potent and Selective Covalent Inhibitors of Transglutaminase 2 for Huntington's Disease. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1021-1046.
142. Quan, Z.-J.; Xia, H.-D.; Zhang, Z.; Da, Y.-X.; Wang, X.-C. Ligand-free CuTC-catalyzed N-arylation of amides, anilines and 4-aminoantipyrene: synthesis of N-arylacrylamides, 4-amido-

-
- N-phenylbenzamides and 4-amino(N-phenyl)antipyrenes. *Appl. Organomet. Chem.* **2014**, *28*, 81-85.
143. Ali, A. A. M.; El-Sawy, N. M.; Al Sagheer, F. A. Radiation Polymerization of 4- N - Acryloylamidobenzonitrile: Amidoximation, Complexation and Biological Activity. *Int. J. Polym. Mater.* **2005**, *54*, 359-373.
144. Zhu, M.; Zhang, C.; Nwachukwu, J. C.; Srinivasan, S.; Cavett, V.; Zheng, Y.; Carlson, K. E.; Dong, C.; Katzenellenbogen, J. A.; Nettles, K. W.; Zhou, H. B. Bicyclic core estrogens as full antagonists: synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of estrogen receptor ligands based on bridged oxabicyclic core arylsulfonamides. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8692-8700.
145. Allen, C. E.; Curran, P. R.; Brearley, A. S.; Boissel, V.; Sviridenko, L.; Press, N. J.; Stonehouse, J. P.; Armstrong, A. Efficient and facile synthesis of acrylamide libraries for protein-guided tethering. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 458-460.